

Untersuchungen zum Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* und auf kinetische Eigenschaften des Purintransportsystems

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus Stadtlander

aus Madrid / Spanien

Berlin 1983



Untersuchungen zum Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* und auf kinetische Eigenschaften des Purintransportsystems

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus Stadlander
aus Madrid / Spanien

Berlin 1983

1. Referent: Priv. Doz. Dr. Jan Ahlers

2. Referent: Priv. Doz. Dr. Horst W. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.1983

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	Zusammenfassung	5
	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	8
1.1.	Zielsetzung	20
2.	Material	25
2.1.	Medien und Lösungen	25
2.2.	Organismus	27
3.	Methoden	28
3.1.	Plasmamembrangewinnung	28
3.2.	Proteinbestimmung	30
3.3.	Lipidextraktion aus den Plasmamembranen	30
3.3.1.	Phosphatgehaltsbestimmung des Lipidextrakts	31
3.3.2.	Bestimmung der Phospholipidzusammen- setzung	32
3.3.3.	Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung	34
3.3.4.	Sterolgehaltsbestimmung	38
3.4.	Aufnahmemessung an ganzen Zellen	39
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Zusammensetzung des Wachstumsmediums	41
4.2.	Supplementierung des Wachstumsmediums mit Phospholipidvorstufen	47

	Seite
4.3. Anzucht von Hefezellen bei verschiedenen Temperaturen	54
4.4. Einfluß der Wachstumsbedingungen der Hefe auf das Purintransportsystem	61
5. Diskussion	75
5.1. Einfluß der Supplementierung des Wachstumsmediums auf den Plasmamembranaufbau	75
5.2. Untersuchungen zur Funktion der Plasmamembran nach Supplementierung des Wachstumsmediums	82
5.3. Einfluß der Wachstumstemperatur auf die Plasmamembranzusammensetzung der Hefezellen	85
5.4. Untersuchungen zur Funktion der Plasmamembranen von bei verschiedenen Temperaturen gezogenen Zellen	93
6. Literaturverzeichnis	100
7. Anhang	104
7.1. Danksagung	104
7.2. Lebenslauf	105

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen der Plasmamembranzusammensetzung über unterschiedliche Wachstumsbedingungen von Hefezellen zu erreichen und den Einfluß dieser Veränderungen auf das Purintransportsystem zu ermitteln.

1. Supplementierung des Wachstumsmediums mit Cholinchlorid (1 mM) führte zu einem erhöhten Anteil an Phosphatidylcholin. Auch der Anteil an ungesättigten Fettsäuren wurde dabei erhöht.
2. Supplementierung des Wachstumsmediums mit Äthanolamin resultierte in einer leichten Erhöhung des Anteils an Phosphatidyläthanolamin. Der Sättigungsgrad der Fettsäuren wurde erhöht.
3. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren war im Phosphatidylinositol-Phosphatidylserin immer sehr hoch.
4. Anzucht der Hefezellen bei 10°C bewirkt eine Erhöhung des Anteils ungesättigter und kürzerkettiger (C 16) Fettsäuren. $V_{\max}$ des Purintransportsystems war sowohl bei 15°C als auch bei 35°C höher als bei den 30°C - Zellen (Kontrolle).

5. Zugabe des peroxidierend wirkenden Herbizids Paraquat zum Wachstumsmedium senkt drastisch den Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in der Plasmamembran ohne eine Veränderung des Phospholipidmusters. Ebenso bewirkte es eine Erniedrigung des $V_{\max}$ -Wertes des Purintransportsystems.
6. Ein Einfluß der Phospholipid- und Fettsäure-Zusammensetzung der Plasmamembran auf ein membrangebundenes Protein, dem Purintransportsystem, konnte mit den eingesetzten Methoden nur teilweise nachgewiesen werden.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANSA	=	8-Anilinonaphtalinsulfonsäure
F.S.	=	Fettsäure(n)
GCP	=	Glucose-Citrat-Puffer
Pc	=	Phosphatidylcholin
Pe	=	Phosphatidyläthanolamin
Pi	=	Phosphatidylinositol
Ps	=	Phosphatidylserin
PPO	=	2,5 - Diphenyloxazol
PQ	=	Paraquat (Methylviologen)
P ₃	=	Plasmamembranfraktion
SM	=	Synthetisches Medium
SMC	=	SM + 1 mM Cholinchlorid
SME	=	SM + 1 mM Äthanolamin
VM	=	Vollmedium

1. EINLEITUNG

Membranen spielen eine bedeutende Rolle innerhalb lebender Zellen. Diese Tatsache ist schon seit langem bekannt und führte zur Diskussion verschiedener Modelle. Während man anfangs annahm, daß Membranen ein relativ starres Gebilde darstellten, entwarfen Singer & Nicolson 1972 (69) in ihrem "fluid mosaic model" (Abb. 1) die Vorstellung, daß es sich um eine mehr dynamische Struktur handelt, dessen Grundgerüst aus Lipiden besteht. In diesem Lipid-Grundgerüst "schwimmen" die Proteine, die eine mehr oder weniger große Beweglichkeit aufweisen.

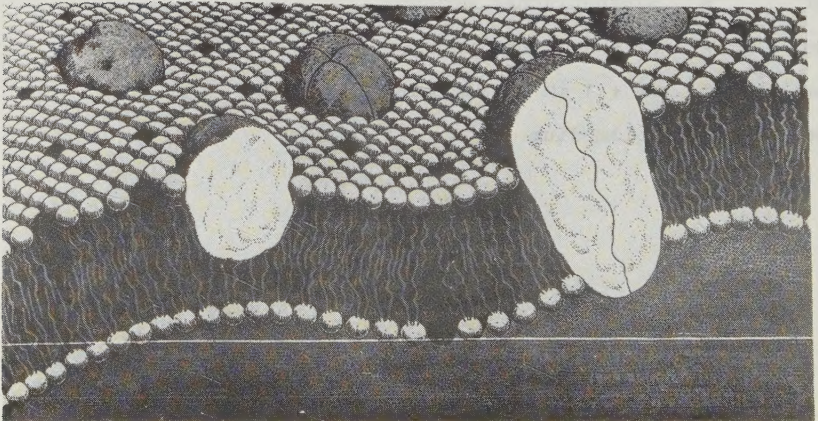


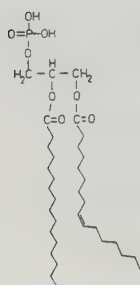
Abb. 1

Das "fluid mosaic model" von Membranen, wie es von Singer & Nicolson (69) 1972 vorgeschlagen wurde. Die schwarzen Punkte in der Phospholipidschicht stellen Sterolmoleküle dar.

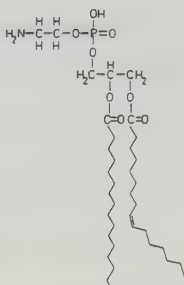
Diese Vorstellungen haben die Membranforschung in den folgenden Jahren stark beeinflusst. In zunehmendem Maße wurde offensichtlich, welche wichtigen Funktionen Membranen in lebenden Systemen einnehmen. Nicht nur, daß diese als Abgrenzung der Zelle gegenüber ihrer Umgebung dienen und schon dadurch eine Schlüsselrolle im Austauschprozeß Zelle - Außenmilieu übernehmen. Auch intrazellulär kommen sie, je nach Stoffwechselaktivität der Zelle, in sehr unterschiedlicher Zusammensetzung vor. Diese Unterschiede im Membranaufbau werden durch die verschiedenartigen Funktionen, die den Membranen obliegen, bedingt. Dadurch ergibt sich ein weites Feld für die Erforschung der Zusammenhänge von Struktur und Funktion.

Membranen setzen sich zusammen aus Phospholipiden, Sterolen und Proteinen. Die ersteren beiden faßt man auch unter dem Oberbegriff Lipide zusammen (Abb. 2).

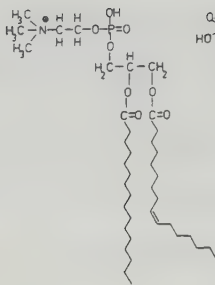




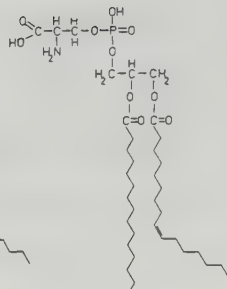
Phosphatidsäure



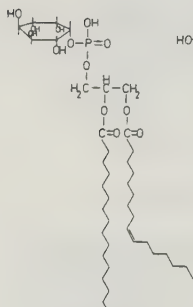
Phosphatidyl ethanolamin



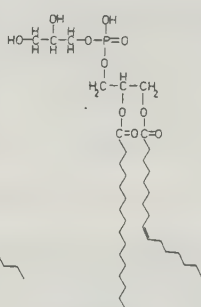
Phosphatidylcholin



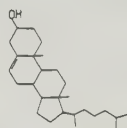
Phosphatidylserin



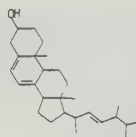
Phosphatidylinositol



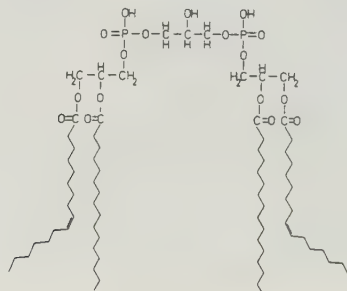
Phosphatidylglycerol



Cholesterol



Ergosterol



Cardiolipin

Abb. 2a

Strukturformeln der Phospholipide und Sterole

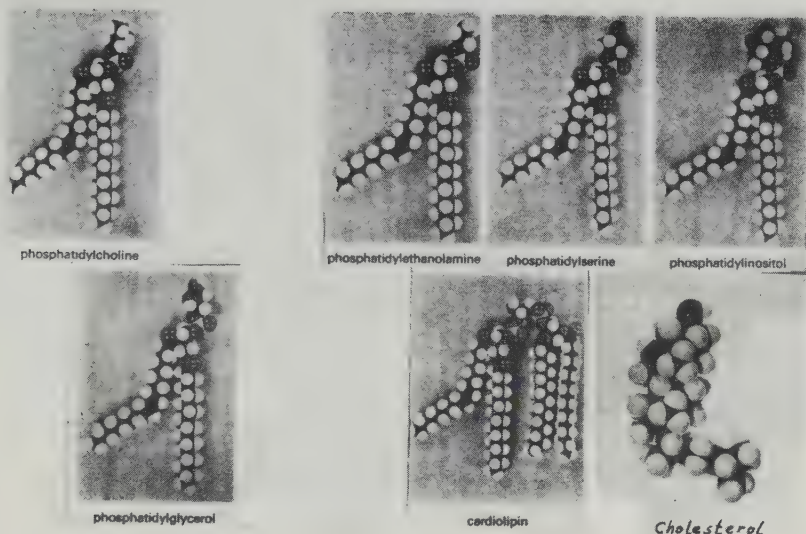


Abb. 2b

Kalottenmodelle der Phospholipide und Sterole

Nach Singer & Nicolson (69) sind es die Lipidmoleküle, die hauptsächlich die Doppelschichtung der Membran, wie sie in elektronenmikroskopischen Bildern gefunden wird, bewirken. Die Eigenschaften der Membranen werden dagegen entscheidend durch die auf- oder eingelagerten Proteine mitbeeinflusst. Das so beschriebene Bild von Membranen ist aber nur eine Erscheinungsform. Zwei Grenzfälle können unterschieden werden: einmal Membranen, bei denen die Proteine prozentual überwiegen, wie z.B. bei Mitochondrien oder Chloroplasten, und die Phospholipide nur noch einen geringen Anteil ausmachen.

Es handelt sich zumeist um stoffwechselaktive Membranen. Zum anderen gibt es Membranen mit isolierendem Charakter, z.B. die Myelinscheiden, die dementsprechend einen sehr hohen Anteil an Phospholipiden und einen geringen an Proteinen aufweisen (Tab. 1).

Estimated Chemical Compositions of Some Membranes

Compound	Percentage of total dry weight of membrane ^a					
	Myelin (bovine)	Retinal rod	Plasma membrane (human erythrocyte)	Mitochondrial membranes	<i>E. coli</i> ^{b,c,d} (inner and outer membranes)	Chloroplasts ^e
Protein	22	59	60	76	75	48
Total lipid	78	41	40	24	25	52 ^f
Phosphatidylcholine	7.5	13	6.9	8.8		
Phosphatidylethanolamine	11.7	6.5	6.5	8.4	18	
Phosphatidylserine	7.1	2.5	3.1			
Phosphatidylinositol	0.6	0.4	0.3	0.75		
Phosphatidylglycerol					4	
Cardiolipin ^g		0.4		4.3	3	
Sphingomyelin	6.4	0.5	6.5			
Glycolipid	22.0	9.5	Trace	Trace		23
Cholesterol	17.0	2.0	9.2	0.24		
Total phospholipid	33	27	24	22.5	25	4.7
Phospholipid as a percent of total lipid	42	66	60	94	>90%	9

^a M. M. Dewey and L. Barr, *Curr. Top. Membr. Transp.* 1, 6 (1970).

^b H. R. Kaback, *Curr. Top. Membr. Transp.* 1, 35-99 (1970).

^c S. Mizushima and H. Yamada, *BBA* 375, 44-53 (1975).

^d I. Yamato, Y. Anraku, and H. Hirose, *J. Biochem. (Tokyo)* 77, 705-718 (1975). These investigators found 67% protein, 21% lipids, 10% carbohydrate, and 2% RNA.

^e H. K. Lichtenthaler and R. B. Park, *Nature (London)* 198, 1070-1072 (1963).

^f About 14% is accounted for by chlorophyll, carotenoids, and quinones.^g

^g Diphosphatidylglycerol (Table 2-8).

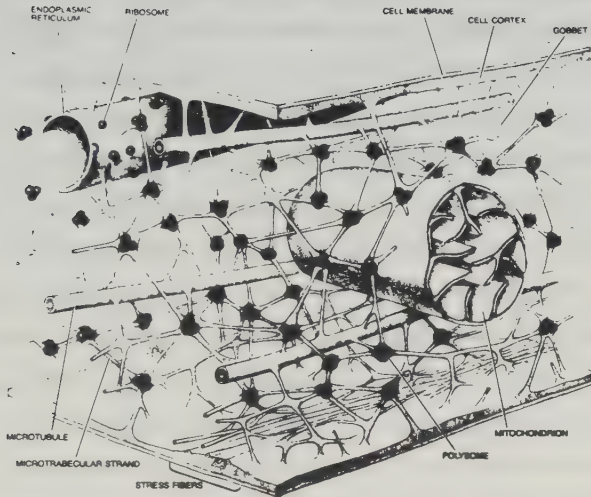
Tab. 1

Zusammensetzung von Membranen aus unterschiedlichen Zelltypen (aus (48)).

Die Erkenntnis, daß Proteine die Eigenschaften von künstlichen Membranen stark verändern, ließ die Frage aufkommen, inwieweit man mit reinen Lipidmembranen eine Erforschung der Eigenschaften von natürlichen Membranen erreichen kann. Mit Hilfe künstlicher Membranen konnten die physiko-chemischen Eigenschaften von natürlichen Membranen sehr gut erforscht und simuliert werden. Sie konnten einfach in ihrer Zusammensetzung gehalten, leicht gehandhabt und gezielt verändert werden. Versuche mit künstlichen Membranen haben wesentlich zum gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse über Membranen beigetragen. Natürliche Membranen sind jedoch sehr viel komplexer und heterogener Natur, so daß sich hier Ergebnisse viel schwerer eindeutig erhalten und interpretieren lassen (70). Sicher aber ist, daß sich natürliche Membranen mit Hilfe von Ergebnissen an künstlichen Membranen näherungsweise recht gut beschreiben lassen, z.B. wie ihr Verhalten in polaren und apolaren Lösungen ist, wie sie aggregieren, welche Stabilität sie aufweisen und wie ihre Funktionsweise gewährleistet werden kann. So gilt das fluid-mosaic-model nach (69) sicher für Areale von natürlichen Membranen, bei denen die Proteine in einem Lipidmeer schwimmen (41). Aber es treten auch nachweislich Areale auf, in denen

hauptsächlich Proteine vorzuliegen scheinen, bei denen sich die Lipide nur noch in Form von Lipidseen wiederfinden. Die Proteine bilden ein loses Netzwerk, das mit Hilfe von Microfilamenten und -fibrillen in dieser Form gehalten wird (65). Diese Microfilamente und -fibrillen bestehen aus Actin und Myosin, zum Teil findet man auch Tubulin, weshalb angenommen wird, daß sie mindestens elastisch sind. Elektronenoptische Befunde führten zu diesem Bild (55, 64, 79).

Vor kurzem zeigten Porter & Tucker (55) auf, daß diese Microfilamente nicht auf die Plasmamembran beschränkt bleiben, sondern sich durch die gesamte Zelle als sogenanntes "microtrabecular lattice" ziehen. Dieses Netzwerk soll neuesten Untersuchungen zufolge sämtliche Zellorganelle in der Zelle räumlich fixieren (Abb. 3). Doch obwohl es mit der Plasmamembran verbunden ist, scheint es andere Eigenschaften als die dort vorkommenden Microfibrillen zu haben, da es biochemisch ablösbar ist. Außerdem konnte es bisher nur in Eukaryontenzellen mit Zellkern nachgewiesen werden.



MODEL OF THE MICROTRABECULAR LATTICE, some 300-800 nm in actual size, was derived from hundreds of images of cultured cells viewed in the high-voltage electron microscope. The model illustrates how the microtrabecular strands are related to the other components of the cell cytoplasm: the substance of the cell outside the cell nucleus. In the model of the microtrabecular strand, the elongated structure of the endoplasmic reticulum (the system of later-

connected channels within the cell where some of the proteins manufactured by the cell are sequestered), the Golgi bodies (the organelles that manufacture ATP, the universal fuel of the cell), the mitochondria (the complex structures that serve many functions of cell structure) and the microfilaments buried in the cell cortex (the layer of material just under the outer membrane of the cell). At junctions of the microtrabecular lattice are polyosomes: organized clusters of ribosomes.

Abb. 3

Ein Modell des "microtrabecular lattice", wie es sich Porter & Tucker vorstellen (aus 55).

Der so beschriebene Zustand der Membran ist jedoch nicht starr, sondern ständiger Veränderung unterworfen, die zum Teil temperaturbedingt ist. Bei Temperaturerhöhung nimmt der Anteil an elektronenoptisch glatten Arealen zu, die aber teilweise von Partikeln (Proteinen) durchsetzt sein können.

Umgekehrt findet man bei Temperaturerniedrigung, daß

Proteine aus dem Lipidmeer in bestimmte Flecken gedrängt werden, wo nur noch sehr wenige Lipidmoleküle vorliegen (13, 64). Im elektronenoptischen Bild sieht dann der überwiegende Teil der Membran geordnet und regelmäßig aus, was an dem gel-Zustand der Lipide liegt, der immer dann eintritt, wenn die Schmelzpunkttemperatur der Membranlipidmischung unterschritten wird. Es ist ein sehr geordneter, fast kristalliner Zustand, in dem die einzelnen Lipidmoleküle sehr stark in der Rotation um ihre Längsachsen eingeschränkt sind (42). Allerdings zeigen hier neuere Versuchsergebnisse von Cullis & Mc Laughlin (17), daß diese Einschränkung für die Phosphatester-Kopfgruppen nicht im gleichen Maße zutrifft, wie sie für die Fettsäureketten gültig ist.

Die Membranfluidität kann stark über das Verhältnis zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren reguliert werden (52), was nach Shinitzky & Henkart (65) auch von metabolisch aktiven Zellen über die Phospholipidsynthese genutzt wird. Je höher der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in der Membran wird, desto niedriger ist der Schmelzpunkt dieser Membran. Das bedeutet, daß in tieferen Temperaturbereichen die Membran noch flüssig gehalten werden kann und die an sie gestellten Anforderungen in Be-

zug auf ihre enzymatischen und Transport-Aktivitäten erfüllt werden können. Aufgrund von Ergebnissen an künstlichen Membranen fordern Klausner et al. (41), daß auch dann sich unterschiedliche Areale bilden, wenn unterschiedliche Fettsäurearten vorliegen. Sie argumentieren stark für das Vorkommen von Lipid-Domänen (cluster), wobei jedes cluster eine bestimmte und einheitliche Fettsäurezusammensetzung hat. Somit gäbe es innerhalb einer Membran Bereiche unterschiedlicher Fluidität.

Die andere Möglichkeit, Membranfluiditätsänderungen bei Eukaryonten zu erreichen, besteht in der Einlagerung von Sterolen, bzw. von Cardiolipin bei Prokaryonten (s. Abb. 2) (88). Sterole sind im Gegensatz zu Cardiolipin, das ein Diphosphoglycerid ist, aber ähnliche Eigenschaften wie Sterole aufweist (88), planare Moleküle. Sie liegen mit ihrer 3-OH-Gruppe in Höhe der Phosphatgruppe der Phospholipide und tauchen mit dem Ringsystem und der hydrophoben Kette in die hydrophobe Fettsäurekettenregion ein. Mit den Phospholipidkopfgruppen treten sie nicht in Interaktion. Je mehr ungesättigte Fettsäuren vorliegen, desto mehr Sterolmoleküle können eingelagert werden (8, 19). Sterole wirken unterhalb des Phasenüberganges der Membran auf diese verflüssigend, oberhalb der kritischen Temperatur verfestigend. In der Kalo-

rimetrie macht sich das in Form einer Verbreiterung des Wärmefaufnahmepeaks bemerkbar, d.h. die Phasenumwandlung der Membran zieht sich über einen weiten Temperaturbereich hin, während vor der Einlagerung von Sterolen ein scharfer Peak auftrat. Demel et al. (19) stellen die Rolle der Sterole in Bezug auf die Membranfunktion ausführlich dar.

Für die anderen Membranbausteine, die Proteine, gibt es nach Singer & Nicolson (69) die Unterteilung in periphere und integrale Proteine (s. Abb. 1). Neuerdings werden Proteine auch aufgrund ihrer Diffusionsfähigkeit in der Membran in drei Arten aufgeteilt: freie, leicht gebundene und immobile Proteine (65). Die meisten aus der letzt genannten Gruppe sind mit den submembranen Microfilamenten assoziiert. An gut untersuchten membrangebundenen Multienzymkomplexen erkannte man, daß eine reibungslose Funktion nur dann gewährleistet ist, wenn die einzelnen Enzyme räumlich eng beieinander liegen. Zu berücksichtigen ist weiterhin der Einfluß der Membranfluidität auf die Aktivität der Membranenzyme. Es wurde beobachtet, daß sich die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} nicht über den gesamten untersuchten Temperaturbereich linear verändern, sondern im Arrheniusdiagramm (K_m oder V_{max} gegen $1/T$ in $Kelvin^{-1}$) teilweise sogar Sprünge in ihrem Kurvenverlauf zeigen.

Unklar ist noch, ob diese Sprünge eine Folge von Konformationsänderungen (42, 43) oder von Diffusionsverhinderungen des untersuchten Proteins (5, 31) sind. Allgemein wird angenommen, daß die Funktion der Membranproteine durch deren Microenvironment, den sie umgebenden Phospholipidmolekülen, sehr stark beeinflusst werden kann, wenn eine Phospholipidabhängigkeit der Proteinaktivität erkannt wird. Nach Chapman et al. (14, 15) oder Kinosita et al. (40) rechnet man dabei mit 80 bis 100 Phospholipidmolekülen. Diese Phospholipid-Abhängigkeit wurde entdeckt, als nach Isolierung und Reinigung von enzymatisch aktiven Membranproteinen deren Aktivität nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr vorhanden war. Nur nach Zugabe von bestimmten Phospholipiden konnten die Proteine zu ihrer vollen enzymatischen Aktivität stimuliert werden. Als Beispiele sollen die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase aus Plasmamembranen, die Ca^{++} -ATPase aus dem sarcoplasmatischen Reticulum und das Lactose-Permease System bei E. coli genannte sein. Eine hervorragende Übersicht über die bis dahin untersuchten Phospholipidabhängigen Systeme gibt Sandermann (62).

1.1. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll versucht werden, die Wechselwirkungen zwischen den Membranbestandteilen und einem enzymatisch aktiven Plasmamembranprotein, dem Purintransportsystem, bei der Hefe zu erfassen. Dazu ist bisher nichts bekannt. Versuche zur Isolierung und Rekonstitution des Purintransportsystems sind bisher nicht geglückt, aber es wird daran gearbeitet (Dr. R. Schmidt, pers. Mitteilung). Die kurz dargestellten Arbeiten wurden und sind im Forschungsprojektschwerpunkt "Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Biomembranen" der F.U. Berlin zusammengefaßt.

Der Mikroorganismus Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, wurde nicht nur deshalb für diese Untersuchungen ausgesucht, weil er vielseitig einsetzbar ist, man denke nur an Brot, Kuchen, Bier, Wein und nicht zuletzt auch Schnaps, sondern weil er als Eukaryont ein ideales Modellsystem darstellt. Er ist leicht zu züchten, kann in großen Mengen kultiviert werden, hat einen kurzen Generationszyklus und weist schon alle für Eukaryontenzellen des höheren Pflanzen- und Tierreiches typischen Zellstrukturen auf. Als

Eukaryont allerdings ist er genetisch nicht mehr so leicht manipulierbar wie Prokaryonten. Der Vorteil aber, daß Forschungsergebnisse viel eher z.B. auf Menschen als höchstorganisierte Eukaryonten übertragen werden können, dürfte diesen Nachteil bei weitem überwiegen.

Für die vorgesehenen Untersuchungen ist die Gewinnung von Plasmamembranen unabdingbare Voraussetzung. Hefezellen haben eine starke Zellwand, die erst durch die enzymatische Behandlung abgebaut werden kann. Die Methode dafür wurde von Ahlers et al. (1) entwickelt, so daß es möglich geworden ist, relativ reine Plasmamembranen aus Hefe zu isolieren, um sie auf ihre Zusammensetzung hin zu untersuchen. Auch Versuche zur Veränderung der Membranzusammensetzung über unterschiedliche Wachstumsbedingungen sind nicht nur bei *Acholeplasma laidlawii* (43), sondern auch bei Hefe unternommen worden. Der bisherige Stand dazu ist bei Nurminen (50) und Rade (57) ausführlich dargestellt. Vor allem Rose und Mitarbeiter haben auf dem Gebiet gearbeitet (36 - 38). So konnten sie bereits 1968 zeigen (45), daß Veränderungen der Membranzusammensetzung eine Folge von unterschiedlichen Anzuchtbedingungen der Hefe waren. Hauptbestandteile der Membranlipide sind dabei Pc

und Pe. Die Biosynthese dieser Moleküle ist in Abb. 4 verkürzt dargestellt (aus 60).

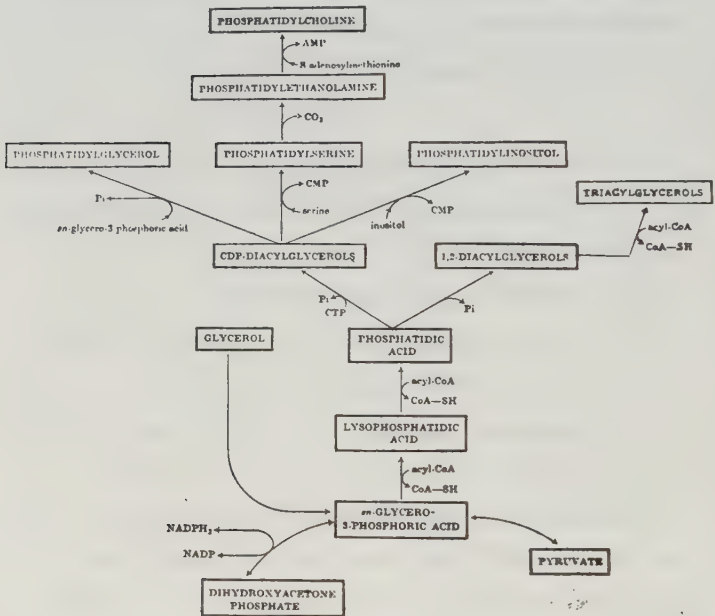


Abb. 4

Dargestellt ist der Biosynthese-Weg von Phospholipiden bei Hefezellen (aus 60).

Der direkte Einbau von Äthanolamin oder Cholin scheint nicht möglich zu sein (60). Dafür spricht auch, daß es bisher nicht gelungen ist, Cholin- oder Äthanolamin-auxotrophe Mutanten zu isolieren. Dage-

gen sind Inosit-auxotrophe Mutanten gefunden worden (16). Sämtliche Enzyme der Phospholipidsynthese sind membrangebunden oder an sie angelagert. Die einzige Ausnahme ist das Enzym, welches Serin an ein CDP-diglycerid ankoppelt (48). Es scheint Ribosomengebunden in der Zelle vorzuliegen. Somit wird die Membranzusammensetzung sehr schnell vor Ort reguliert (52). Der Abbau der Phospholipide wird durch die Phospholipasen A, B, C und D und der Lysophospholipase gewährleistet (60).

Bei den bisherigen Untersuchungen fehlt eine Korrelation zwischen den induzierten Veränderungen der Plasmamembranzusammensetzung und der Funktion von in dieser Membran befindlichen aktiven Enzymen. In der vorliegenden Arbeit wird das Purintransportsystem, das ein solches Membranprotein darstellt, als Modellsystem für solche Versuche eingesetzt. Es erkennt und transportiert energieabhängig die Purine Adenin, Guanin und Hypoxanthin und das Pyrimidin Cytosin in die Zelle (58), wo diese Basen als wichtiger Bestandteil der Nukleinsäuren in Form von Nukleosiden und Nukleotiden gespeichert werden. Ebenso dienen sie als Mono-, Di- oder Triphosphate der Energiegewinnung und -speicherung innerhalb der Zelle. Nukleoside und Nukleotide werden aber von dem Transportsystem

nicht transportiert. Eine Hemmung mit Basenanaloga ist jedoch möglich (72, 84). Außerdem wurde bereits ein Mechanismus zum Transportvorgang, der pH-abhängig ist, vorgeschlagen (26). Er erwies sich als ein Protonen-Symport und K^+ -Antiport (59). Der Sinn dieses Transportsystems liegt für die Zelle darin, daß sie sich die energieverzehrende Synthese der Basen sparen kann, wenn solche Basen im sie umgebenden Medium vorliegen.

In den im Anschluß geschilderten Untersuchungen soll aufgezeigt werden, welchen Einfluß unterschiedliche Wachstumsbedingungen auf die Membranzusammensetzung ausüben und welchen Einfluß eine veränderte Membran auf die kinetischen Parameter $V_{\max}$ und K_m des Purintransportsystems haben. Parallel zu diesen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe "Biomembranen" der F.U. Berlin Versuche an zwei anderen Membransystemen, der Mg^{++} ATPase (1,2,4) und der Chitinsynthase (23) durchgeführt.

2. MATERIAL

Es wurden bezogen (im Reinheitsgrad p.A.):

8-¹⁴C-Hypoxanthin (54Ci/mol) von NEN, 6072 Dreieich, Glasfaserfilter Selectron Typ GF 92 von Schleicher und Schüll, 3354 Dassel; Purine und Pyrimidine von Pharma Waldhof, 8750 Aschaffenburg; Schneckenenzym von L'Industrie Biologique Française, F-Clichy; Phospholipide und Fettsäuren als Referenzen von Serva, 6900 Heidelberg; Yeast-Extrakt von Difco, O. Nordwald, 2000 Hamburg; Enzyme und enzymatische Testkits von Boehringer, 6800 Mannheim.

Alle anderen Substanzen von Merck, 6100 Darmstadt.

2.1. Medien und Lösungen

Vollmedium (VM)

2 % (w/v)	Glucose
1 % (w/v)	Yeast-Extrakt
0,5% (w/v)	Pepton

Für die Herstellung von festen Medien wurde zusätzlich 2% (w/v) Agar zugegeben

Synthetisches Medium (SM)

2 % (w/v) Glucose

2 % (w/v) Ammoniumsulfat

1 g/l KH_2PO_4

500 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 mg/l NaCl

100 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

als Spurenelemente pro l : 500 μg H_3BO_3 , 470 μg

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 400 μg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 μg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,

120 μg $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 μg KJ , 40 μg

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

als Vitaminzusatz pro l : 10 mg Nicotinsäure,

10 mg m-Inositol , 1 mg Kalziumpanthotenat,

500 μg Thiaminhydrochlorid,

500 μg Pyridoxinhydrochlorid,

20 μg Biotin

Glucose - Citrat - Puffer (GCP)

2 % (w/v) Glucose

50 mM Natriumcitrat / Citronensäure

pH 3,5

Die Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser zubereitet, 15 min. bei 115°C autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2. Organismus

Es stand die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Wildstamm R XII (Labor Dr. Kotyk, Prag) zur Verfügung. Sie wurde bei 4°C auf Schrägagarröhrchen gehalten. Durch monatliches Überimpfen auf neue Schrägagarröhrchen wurde R XII immer wieder aufgefrischt.

3. METHODEN

3.1. Gewinnung einer Plasmamembranfraktion

Die Plasmamembranen wurden aus Hefesphaeroplasten mit Hilfe von osmotischen Schock, Homogenisierung und differentieller Zentrifugation gewonnen. Es wurde nach der von Ahlers et al. (1) beschriebenen Methode vorgegangen. Allerdings wurden die einzelnen Aufarbeitungsschritte bei derjenigen Temperatur durchgeführt, bei der die Hefezellen aufgezo- gen waren. Dadurch ergaben sich folgende veränderte Zeiten: bei 10°C wurden die Inkubationszeiten ver- vierfacht, außerdem wurde die doppelte Menge an 1.2M KCL zur Stabilisierung der Zellen/Sphaeroplasten während der Schneckenenzymbehandlung eingesetzt. Bei den 40°C-Zellen reichten die eineinhalbfachen Inkuba- tionszeiten aus.

Die Zentrifugationsschritte wurden ebenfalls etwas abgewandelt (wie bereits von Fähnrich (22) beschrie- ben) und sind in der Abbildung 5 dargestellt.

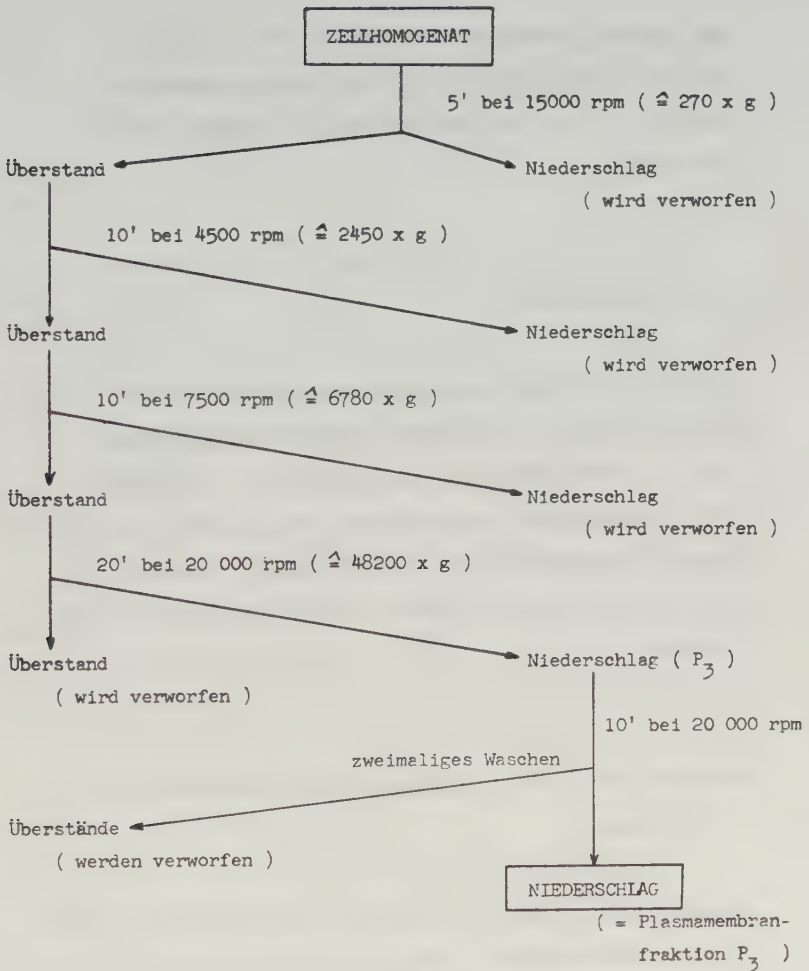


Abb. 5:
Zentrifugationsschritte in der Sorvall-Zentrifuge,
Rotortyp SS 34

Der letzte Niederschlag wurde in Tris-Cl-Puffer, pH 7.5, resuspendiert (2×10^{10} Zellen Ausgangsmaterial / ml) und stellte die Plasmamembranfraktion dar.

3.2. Proteinbestimmung

Mit der Plasmamembranfraktion wurde nach kurzer Homogenisierung im Potter-Elvehjem-Homogenisator eine Proteinbestimmung nach Schaffner und Weissmann (63) durchgeführt. Als Standard diente Humanserumalbumin. Die Bestimmungen wurden hauptsächlich von einem Arbeitsgruppenmitglied, Gerda Breitenreuter (12) durchgeführt.

3.3. Herstellung eines Lipidextraktes aus der Plasmamembranfraktion

Ein Milliliter der Plasmamembranfraktion wurde unter Stickstoffatmosphäre gefriergetrocknet und mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (2:1) mehrmals extrahiert (25). Der Extrakt wurde im Rotationsverdampfer bei 30°C getrocknet und unter Stickstoff in 250 -

500 μl Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen. Er kann bei -20°C unter Stickstoff in der Tiefkühltruhe gelagert werden.

3.3.1. Bestimmung des Phosphatgehalts

Für die Phosphatbestimmung wurde die Methode von Sokoloff et al. (71) verwendet. In verschließbaren, phosphatfreien Reagenzgläsern wurden zu 10 - 100 μl Probe 100 μl HClO_4 konz./ H_2SO_4 konz. (1:1) zugegeben, die Mischung 1 h bei $180 - 200^{\circ}\text{C}$ verascht und anschließend abgekühlt. Um auch geringste Spuren von Phosphat aus den Reagenzgläsern zu beseitigen, wurden sie vorher über Nacht in HNO_3 / H_2SO_4 (1:1) gelegt und anschließend gründlich mit H_2O bidest. gespült. Zu den veraschten Proben wurden nacheinander folgende Lösungen gegeben:

1 ml H_2O
100 μl 5 % Ammoniummolybdat
50 μl 0.15 % Hydraziniumsulfat,

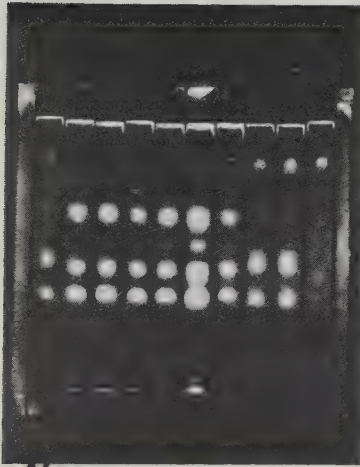
dann gut gemischt und 15 - 20 min. bei $95 - 100^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Nach der Abkühlung wurden die blaugefärbten Proben bei 830 nm photometriert. Bei Überschreiten der Extinktion des Standards (1 μg

Phosphat) von 0.7 wurde mit 1 N H_2SO_4 verdünnt. Wurde die Veraschung in dem doppelten Säurevolumen vorgenommen, mußten auch die Volumina der anderen zuzugebenden Lösungen verdoppelt werden.

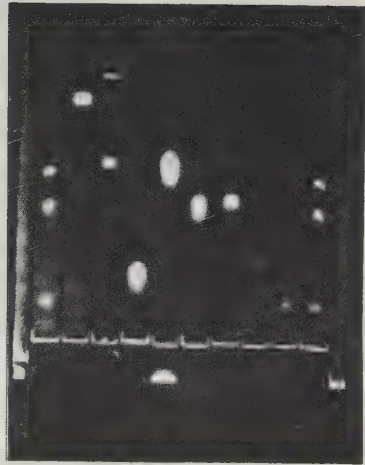
3.3.2. Auftrennung und Analyse der Phospholipide im Plasmamembranextrakt

Ein Teil des Lipidextraktes (ca. 1/5) wurde je zweimal auf eine, in Chloroform : Methanol (2:1) vorgereinigten, Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, Merck, 0.25 mm Schicht) mit einem CAMAG Linomat III strichförmig aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte nach Peter & Wolf (54), modifiziert von Bigalke (10) in Chloroform, Aceton, Methanol, Eisessig, Wasser (50:30:25:12:7). Mit ANSA (0.1 % in H_2O) wurden die Phospholipide nach dem Lauf unter UV bei 254 nm sichtbar gemacht (35) und mit Bleistift gekennzeichnet (Abb. 6). Jeder Flecken wurde einzeln ausgekratzt, mit Chloroform/Methanol (1:1) extrahiert und nach Einengen dieses Extraktes wurde der Phosphatgehalt bestimmt. Da parallel dazu eine Doppelbestimmung des Gesamtphosphatgehaltes des Lipidextraktes durchgeführt wurde, konnte der prozentuale Anteil des jeweiligen Phospholipids ermittelt werden, mit Ausnah-

me von Pi und Ps, die nach dieser Methode nicht voneinander getrennt werden.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



M PA PI PC LPE M
PE PS PG LPC

Abb. 6

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipide aus den Plasmamembranextrakten (linker Teil) und von Referenzen zur Identifizierung (rechter Teil) nach Besprühung mit 0.1 %iger ANSA-Lösung.

1 = wie M

7 = VM 40°C

2 = VM 10°C

8 = 40 µl von M

3 = VM 30°C

9 = 80 µl von M

4 = SMC 30°C

10 = nur Pa

5 = SME 30°C

M = 40 µl einer Mischung
aus Pc, Pi, Pe und Pa

6 = VM + PQ

LPC = Lyso-Pc

LPe = Lyso-Pe

3.3.3. Analyse des Fettsäurespektrums im Plasmamembran-extrakt

Es wurden entweder das Fettsäurespektrum des Lipid-extrakts oder dasjenige der einzelnen, nach 3.3.2. aufgetrennten, Phospholipide bestimmt.

Die Proben wurden nach Weinmann (82) mit 2.5 ml Bortrifluorid (14 % in Methanol) versetzt und zur Fettsäuremethylierung 3 h bei 60°C inkubiert. Die Fettsäuremethylester wurden anschließend mit Hexan mehrmals extrahiert, auf eine vorgereinigte Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, Merck, 0.25 mm Schicht) aufgetragen (Reinigungslauf in HCCl_3 /Methanol = 2:1) und in Petroläther / Diäthyläther (9:1) entwickelt. Die freien Fettsäuren liefen kurz unterhalb der Front, davon getrennt auf halber Strecke liefen die Fettsäuremethylester (Abb. 7), die mit destilliertem Hexan in vorgespülten Gläsern extrahiert, eingeengt und unter Stickstoff in der Tiefkühltruhe bei -20°C gelagert wurden.

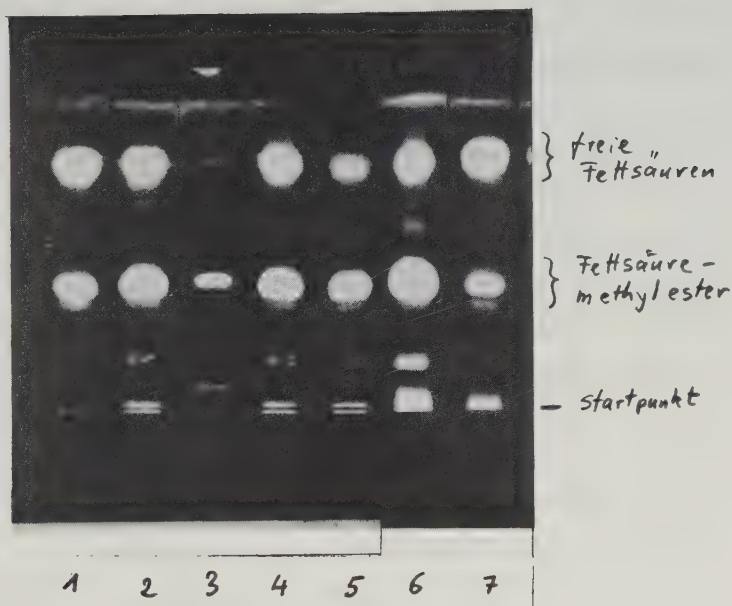


Abb. 7
Dünnschichtchromatographische Trennung der Fettsäuremethylester von den freien Fettsäuren aus Plasmamembranextrakten für die weitere Analyse im Gaschromatographen.

1 = VM 10°C

2 = VM 30°C

3 = methyl.Heptadecensäure.
als Referenz

4 = SMC 30°C

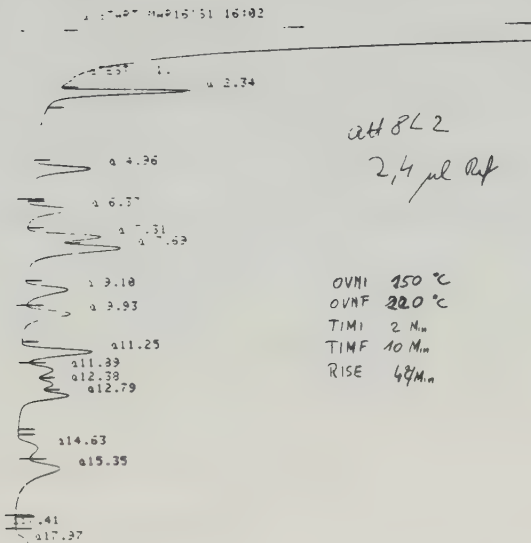
5 = SME 30°C

6 = VM + PQ

7 = VM 40°C

Für die Analyse im Gaschromatographen wurden die Proben vakuumgetrocknet und in 20 μl CS_2 gelöst. Von dieser Lösung wurden je 1 - 5 μl mit einer gasdichten Hamilton-Auftragespritze auf die Säule eines Packard Gaschromatographen Modell 433 aufgetragen. Injektionsort und Flammenionisationsdetektoren wurden auf 250°C gehalten. Die 1/4''x 7 ft langen Glas-säulen waren mit Silar 10 C auf Gaschrom Q (100 - 120 mesh) (von WGA in 6103 Griesheim) gepackt. Der isotherme Referenzlauf wurde bei 180°C durchgeführt. Das Temperaturprogramm für einen schnelleren Lauf wurde mit 2 min. bei 150°C gestartet, dann bis 220°C mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 4°C / min. gesteigert, und diese Endtemperatur wurde 10 min. lang gehalten, bevor die Säulen wieder abgekühlt wurden, um dann für den nächsten Lauf wieder verwendbar zu sein. Die Gasdurchflußgeschwindigkeiten waren auf 18 ml/min. H_2 , 250 ml/min. O_2 und 40 ml/min. N_2 als Trägergas eingestellt.

Durch Integration der entsprechenden Peakfläche wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Fettsäure ermittelt (Abb. 8).



at 84.2

2,4 µl Ref

OVNI 150 °C
OVNF 220 °C
TIME 2 Min
TIME 10 Min
RISE 48 Min

IN	TYP	RET.M	QUSER	Q.	WPEA	WPEA %	HEIGHT	SLPS
14	SS	2.348	1	C12:0	621346	9.082	58250	SLPS 0.1
14	SS	4.366	2	C14:1	412404	6.124	25360	ASLP 0
14	SS	6.379	3	C16:0	365575	5.338	20360	PMW 0.2
14	U	7.313	4	C16:1	515368	7.533	33000	MINA 10
14	U	7.695	5	C17:0	210425	13.30	41320	ISPY 1
14	U	9.105	6	C18:0	417212	6.032	13530	ISPY 30.
14	U	9.336	7	C18:1	477377	6.394	21270	
14	U	11.259	3	C18:2	564331	9.250	31610	
14	U	11.390	3	C20:0	336214	4.933	14430	
14	U	12.380	10	C20:1	255140	4.353	14730	
14	U	12.792	11	C19:3	467547	6.027	22100	
14	U	14.436	12	C22:0	233439	4.227	9267	
14	U	15.354	13	C22:1	761021	11.11	13500	
14	U	17.377	14	C24:1	440206	6.428	7110	
TOTALS			14		6843205	100.0		

Abb. 8

Darstellung eines Referenzlaufes im Temperaturprogramm eines Gaschromatographen mit anschließender Auswertung der Peaks und deren Flächen.

3.3.4. Bestimmung des Sterolgehaltes der Plasmamembranfraktion

Die Sterole und Sterolester der Lipidextrakte wandern (mit Neutralfetten und freien Fettsäuren) bei der Phospholipidauftrennung an der Front, so daß für die Sterolbestimmung diese Fronten von der DC-Platte gekratzt und in Chloroform extrahiert wurden. Nach Eintrocknen wurde die Probe in Methanol aufgenommen und eine Sterolbestimmung mit Hilfe des Boehringer Bestimmungsansatzes für Cholesterol (Nr. 124079) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einem enzymatischen Farbstest, wobei mit der Cholesterinesterase, der -oxidase und der Katalase der gelbe Farbstoff Lutidin gebildet wird, der bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Als Referenz diente eine Ergosterol/Methanol-Lösung (1 mg/ml). Die Ansatzmengen, die von Boehringer angegeben werden, wurden ohne Einfluß auf das Endergebnis wie folgt reduziert:

Probe in Methanol

- + 2 ml Katalase/Methanol-Lösung
- + 100 μ l Acetylaceton-Lösung
- + 20 μ l Cholesterinesterase
- + 20 μ l Cholesterinoxidase

3.4. Aufnahmeversuche

Präinkubation

Wegen der stark aktivierenden Wirkung (58) auf die Basenaufnahme wurden Zellen aus der stationären Phase ($1 - 2 \times 10^8$ Zellen/ml) in einer Zelldichte von $4 - 5 \times 10^7$ /ml in GCP resuspendiert und unter guter Belüftung und ständigem Rühren bei der Wachstumstemperatur präinkubiert. Diese Präinkubation dauerte bei den bei 30°C aufgezogenen Zellen 1 h, bei den 10°C -Zellen 4 h und bei den 40°C -Zellen 1,5 h.

Aufnahmemessung

Die Zellen wurden nach der Präinkubation abzentrifugiert, mit H_2O einmal gewaschen und in GCP resuspendiert. Der Zelltitert wurde dabei so gewählt, daß die fünffache Zelldichte des Inkubationsansatzes erreicht wurde.

Der Inkubationsansatz bestand aus:

750 μl GCP pH 3.5

50 μl markiertes Hypoxanthin in Wasser

200 μl Zellsuspension

Je nach Inkubationstemperatur wurde die Substratkonzentration von 0.05 - 5 μ M und die Aufnahmezeit von 20 min. bis 30 sec. gewählt. Wegen der langsamen Aufnahme bei Temperaturen unter 15°C wurden Schwankungen der Meßwerte festgestellt. Zur Sicherstellung des Ergebnisses wurden daher Mehrfachmessungen bei unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von GCP gestoppt, die Zellen auf je einem Glasfaserfilter (GF 92 von Schleicher & Schüll) in einem Millipore - Vielfachfiltrationsgerät gesammelt, die feuchten Filter bei 60 - 100°C getrocknet, in Szintillationsfläschchen mit 2 ml Szintillationscocktail (5 g PPO / 1 Toluol) versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler ihre Radioaktivität bestimmt. Vor dem Abfiltrieren der Zellen wurden die Glasfaserfilter mit einer 1mM Lösung des nicht markierten Substrats benetzt, um eine unspezifische Bindung des markierten Substrates am Filter zu vermeiden. Aus dem gleichen Grund wurden die Zellen nach dem Abfiltrieren auf den Filtern noch einmal mit GCP pH 3.5 nachgewaschen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Ermittlung eines optimalen synthetischen Wachstumsmediums

Ausgehend von dem üblichen Vollmedium wurde versucht, die Komponenten Hefeextrakt und Peptone durch genau definierte Substanzen zu ersetzen um ein Medium zu erhalten, das gezielt in seiner Zusammensetzung verändert werden kann. Daher mußten Salze, Vitamine und Spurenelemente zugesetzt werden. Als wichtiger Bestandteil war Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat zuzugeben. Mit Glucose wird der Hefe nicht nur Energie, sondern auch eine Kohlenwasserstoffquelle zur Verfügung gestellt.

Es wurden die beiden Hauptbestandteile, Glucose und Ammoniumsulfat, gegeneinander variiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

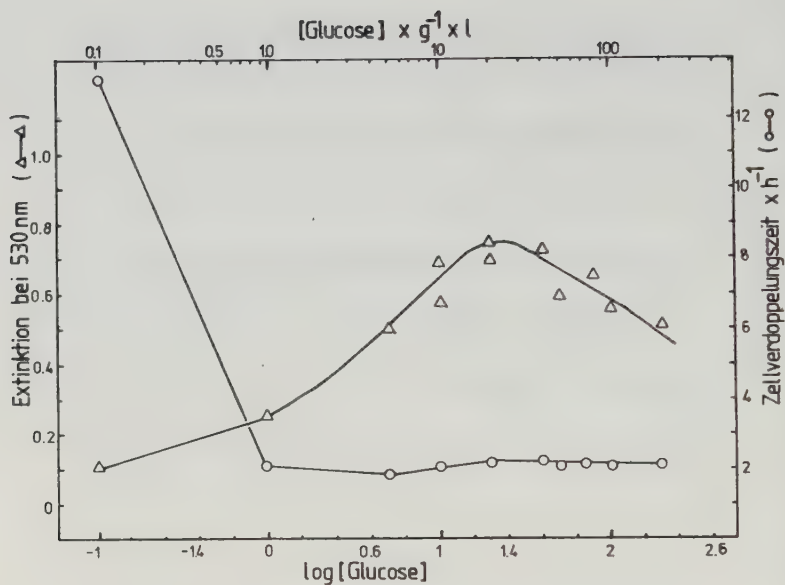


Abb. 9

Abhängigkeit der maximal erreichten Zellzahl (Δ) und der Zellverdoppelungszeit t_d (○) von der Glucosekonzentration im Medium (in g/l) bei einer konstanten Ammoniumsulfatkonzentration von 2 %. Es wurde die Extinktion bei 530 nm als Maß für die Zellzahl verwendet.

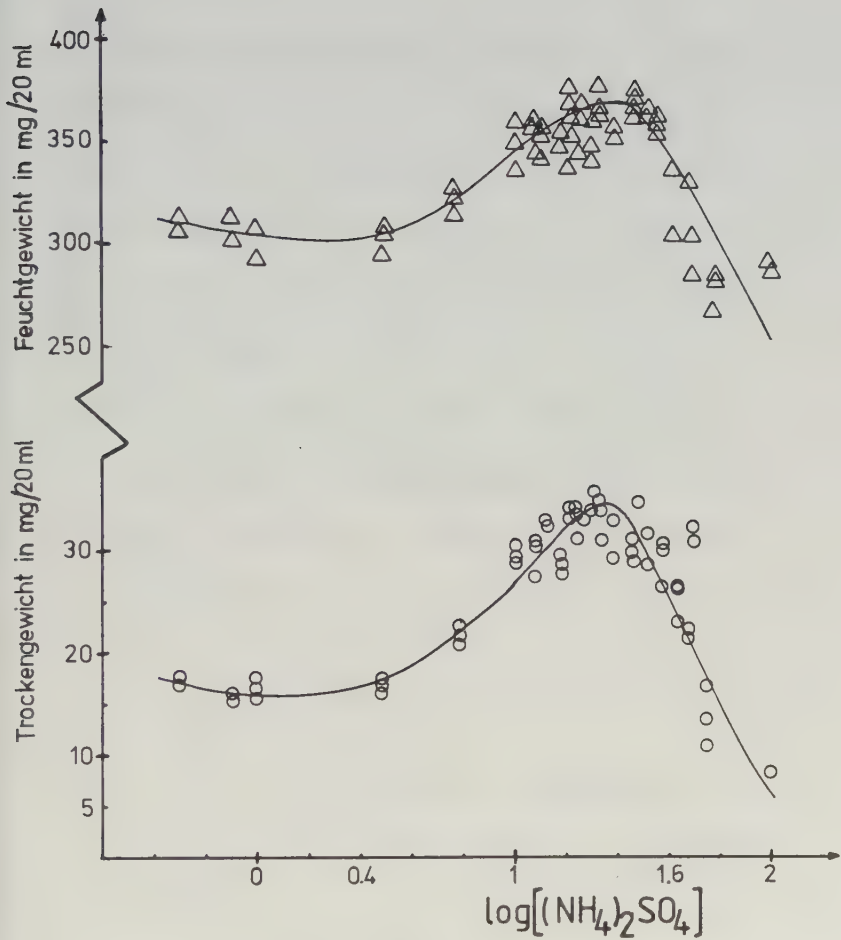


Abb. 10
Abhängigkeit der Zellendkonzentration nach 48 h in
mg Feucht- (Δ) bzw. Trockengewicht (O) von der
Ammoniumsulfatkonzentration (in g/l) des Wachstums-
mediums bei einer konstanten Glucosekonzentration
von 2 %.

Optimale Konzentration für ideales Wachstum sind also 1.5 bis 3 % Glucose und 1.5 bis 2.5 % Ammoniumsulfat. Die Ermittlung der optimalen Konzentration für Vitamine und Spurenelemente ist in der Abbildung 11 dargestellt. Es wird das Zelltrockengewicht in Gegenwart von entweder Spurenelemente oder Vitaminen oder beiden zusammen gezeigt. Für diese Versuche wurden Zellen verwendet, die vorher mindestens zwei Tage lang nur in Wasser inkubiert worden waren. In den unterschiedlich supplementierten Medien wurden sie drei Tage lang gehalten, bevor ihr Trockengewicht nach mehrmaligem Waschen mit H_2O bestimmt wurde.

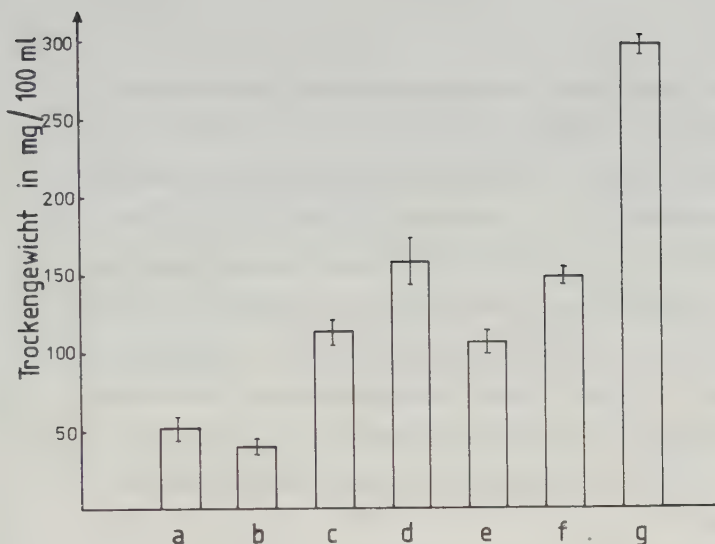


Abb. 11

Abhängigkeit des Zellwachstums im synthetischen Medium (SM) von der Zugabe von Spurenelementen und/oder Vitaminen. Als Vergleich wurden Kulturen in Vollmedium (VM) genommen.

- a) 10 ml der gewaschenen, 2 d lang nur in H_2O gehaltenen, Zellvorkultur, die in jeden der folgenden Ansätze gegeben wurde
- b) 100 ml einer Zellkultur in H_2O
- c) 100 ml einer Zellkultur in SM ohne Vitamine, ohne Spurenelemente
- d) 100 ml einer Zellkultur in SM nur mit Vitaminen
- e) 100 ml einer Zellkultur in SM nur mit Spurenelementen
- f) 100 ml einer Zellkultur in SM mit Spurenelementen und mit Vitaminen
- g) 100 ml einer Zellkultur im Vollmedium (VM)

Die Zellen waren 2 Tage in H_2O bei guter Belüftung inkubiert worden, dann wurden je 10 ml davon in die entsprechenden 100 ml-Medien pipettiert und 3 Tage lang bei Belüftung kultiviert. Dargestellt ist das Trockengewicht der mehrmals mit H_2O gewaschenen Zellen in mg. Es handelt sich um Doppelansätze. Die Pfeile stellen die Abweichung von Dreifachmessungen dar.

In Vorversuchen hatte sich ergeben, daß das Zellwachstum abhängig von der Zugabe der Vitamine ist, nicht immer jedoch von der Anwesenheit von Spurenelementen. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in einer Kultur immer Zellen absterben und dabei ihren Inhalt ins Medium geben. So scheinen Zellen aus einer Vorkultur noch genügend Spurenelemente zu haben (evtl. auch gespeichert), die, wenn sie beim Tod der Zelle ins Medium gelangen, von den anderen Zellen aufgenommen werden und deren Wachstum fördern.

Die gefundenen Konzentrationen des synthetischen Mediums an Vitaminen und Spurenelementen sind unter 2.1 bei den Medien (SM) aufgelistet, da nun mit diesem Medium gearbeitet wurde.

In der Abbildung 12 ist das Wachstum der Zellen bei gleichen Bedingungen in SM oder VM dargestellt. Die Unterschiede sind sehr gering. Die Zellverdoppelungszeit t_d beträgt bei SM-Zellen 1.33 h und bei VM-Zellen 1.25 h.

4.2. Supplementierung des SM mit Phospholipidvorstufen

Hossack et al. (36) zeigten 1977, daß das Wachstum von Hefe in supplementierten Medien deren Membranzusammensetzung beeinflußt. Sie untersuchten allerdings nur die Gesamtmembranfraktion. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, durch Zugabe von 1 mM Cholinchlorid oder 1 mM Äthanolamin zum SM unter Konstanthaltung der übrigen Parameter, die Plasmamembranen der Hefezellen in ihrer Zusammensetzung zu verändern.

Aus Abbildung 12 wird ersichtlich, daß das Wachstumsverhalten der Zellen durch diese Phospholipidvorstufen nicht verändert wird.

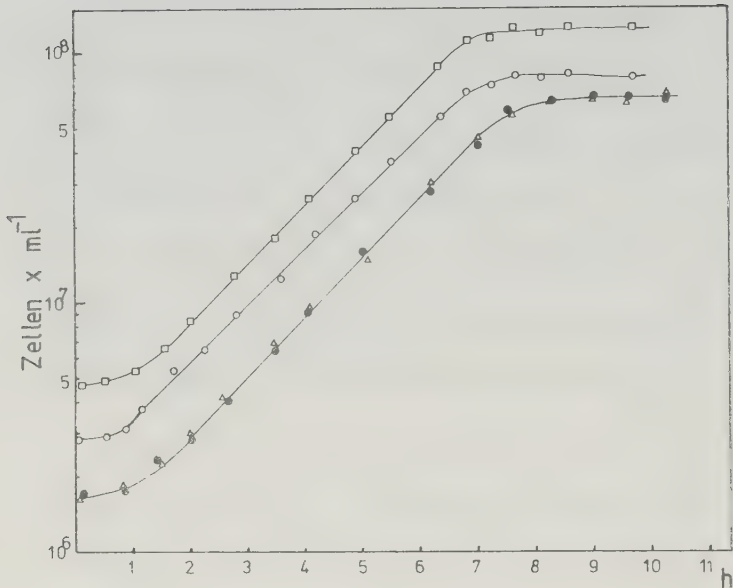


Abb. 12
Wachstumskurven von Hefezellen (RXII) in VM (□), SM (○), SM ergänzt mit 1 mM Cholinchlorid (△) oder 1 mM Äthanolamin (●) bei 30°C und Belüftung. Zellverdoppelungszeit $t_d = 80$ min. der SM-Kultur und 73 min. bei den beiden supplementierten Kulturen

Die Phospholipidzusammensetzung der nach 3.1. gewonnenen Plasmamembranen ist in der Abbildung 13 dargestellt. Ein Einfluß der unterschiedlichen Supplementierung auf die Phospholipidzusammensetzung der Hefepasmamembran ist deutlich erkennbar.

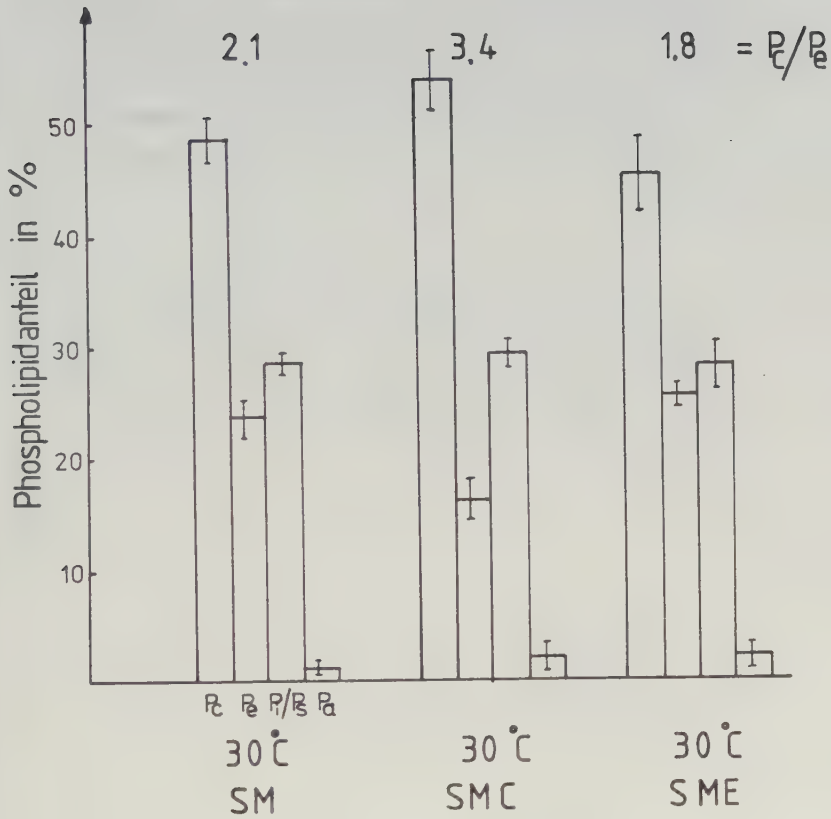


Abb. 13

Prozentuale Verteilung der einzelnen Phospholipide in den Plasmamembranen von Hefezellen (RXII), die in unterschiedlich supplementierten SM-Medien gezogen wurden. Die Pfeile stellen die Standardabweichung aus 8 - 10 Messwerten dar.

Die Supplementierung des Wachstumsmediums mit Cholinchlorid führt zu einer Erhöhung des Anteils an Pc auf Kosten von Pe, während die Zugabe von Äthanolamin eine leichte Erhöhung des Pe-Gehaltes gegenüber der Kontrolle und eine Verringerung des Pc-Anteils bewirkt.

Für das Fettsäuremuster des Gesamtextraktes der Plasmamembranen ergeben sich die in der Abbildung 14 dargestellten Unterschiede. Vergleichend dazu ist in der Tabelle 4 die Fettsäureverteilung in den einzelnen Phospholipiden angegeben.

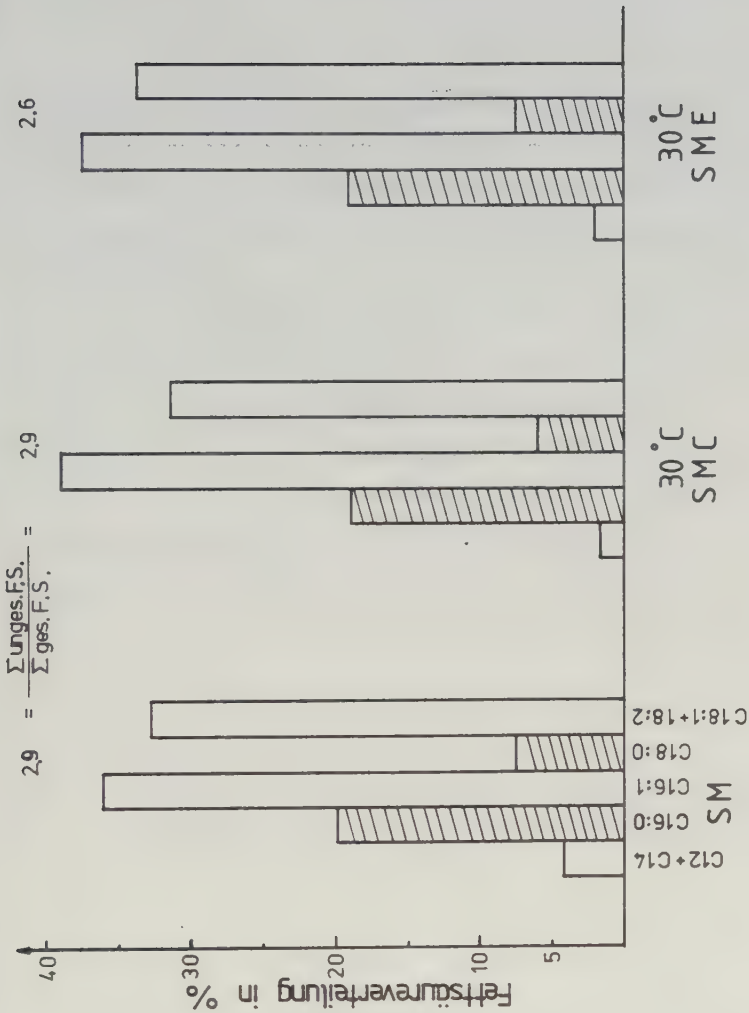


Abb. 14

Prozentuale Verteilung der Fettsäuren im Gesamtplasma-membranextrakt von Zellen, die in unterschiedlich ergänzten Wachstumsmedien gezogen wurden. Die Zahlen geben die Kettenlänge sowie die Anzahl der Doppelbin-dungen der Fettsäuren an. Die Standardabweichungen waren in allen Fällen kleiner als 15 %.

Sowohl bei den SMC-Zellen als auch bei den SME-Zellen ist eine Erhöhung des Fettsäureanteils von langkettigen Fettsäuren erkennbar. Bei den in SMC gezüchteten Zellen wird der Unterschied in den Anteilen an C 16 : 1 und C 18 : 1 deutlicher als bei den Zellen aus SME. Das heißt, die SMC-Zellen verstärken fast ausschließlich den Anteil an Palmitoleinsäuren, während die SME-Zellen sowohl mehr Palmitoleinsäure als auch Ölsäure anteilig einbauen, verglichen mit den Kontrollzellen.

Insgesamt sind allerdings die durch die unterschiedliche Ergänzung des SM erzielten Unterschiede im Fettsäuremuster der Plasmamembranen gering.

Der ermittelte Gesamthosphat- und Sterolgehalt für die Plasmamembranen ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Wachstums- bedingungen	G E H A L T				Trockengewicht mg / ml P ₃
	Protein mg/ml P ₃	Phosphat µg/mg Protein	Sterolen µg/mg Protein	A N	
SM _{30°C}	1,9 $\pm$ 0,20	31,0 $\pm$ 12,0	167 $\pm$ 43		9,6 $\pm$ 0,4
VM _{30°C}	1,6 $\pm$ 0,30	29,0 $\pm$ 10,0	178 $\pm$ 52		9,1 $\pm$ 0,5
SMC _{30°C}	0,8 $\pm$ 0,15	24,7 $\pm$ 10,7	251 $\pm$ 76		9,5 $\pm$ 0,6
SME _{30°C}	1,4 $\pm$ 0,30	31,6 $\pm$ 13,7	204 $\pm$ 63		6,4 $\pm$ 0,4

Tab. 2

Gesamtphosphat- und Sterolgehalt von Plasmamembranen von in unterschiedlich ergänzten Medien gezogenen Hefezellen (P₃ = Plasmamembranfraktion). Die Daten stammen aus 3 bis 5 Einzelmessungen.

Bei den SMC-Zellen ist eine leichte Erhöhung des Sterolgehaltes auf Kosten des Proteingehaltes zu erkennen. Durch die hohen Streuungen ist jedoch eine Signifikanz der Unterschiede nicht gegeben.

4.3. Anzucht der Hefezellen bei verschiedenen Temperaturen

Hefezellen vom Stamm R XII können innerhalb eines Temperaturbereiches von 7°C bis 40°C wachsen. Deshalb wurden Zellen bei 10°C , bei 30°C und bei 40°C gezogen und miteinander verglichen. Die Standardwachstumstemperatur war bisher immer 30°C , und deshalb wird diese Kultur als Referenz benutzt werden. Das unterschiedliche Zellwachstum ist in der Abbildung 15 dargestellt. Die Zellverdoppelungszeit t_d beträgt bei 10°C 9.5 h, bei 30°C 1.25 h und bei 40°C 1.7 h. Diese Ergebnisse wurden durch Rade (57) bestätigt.

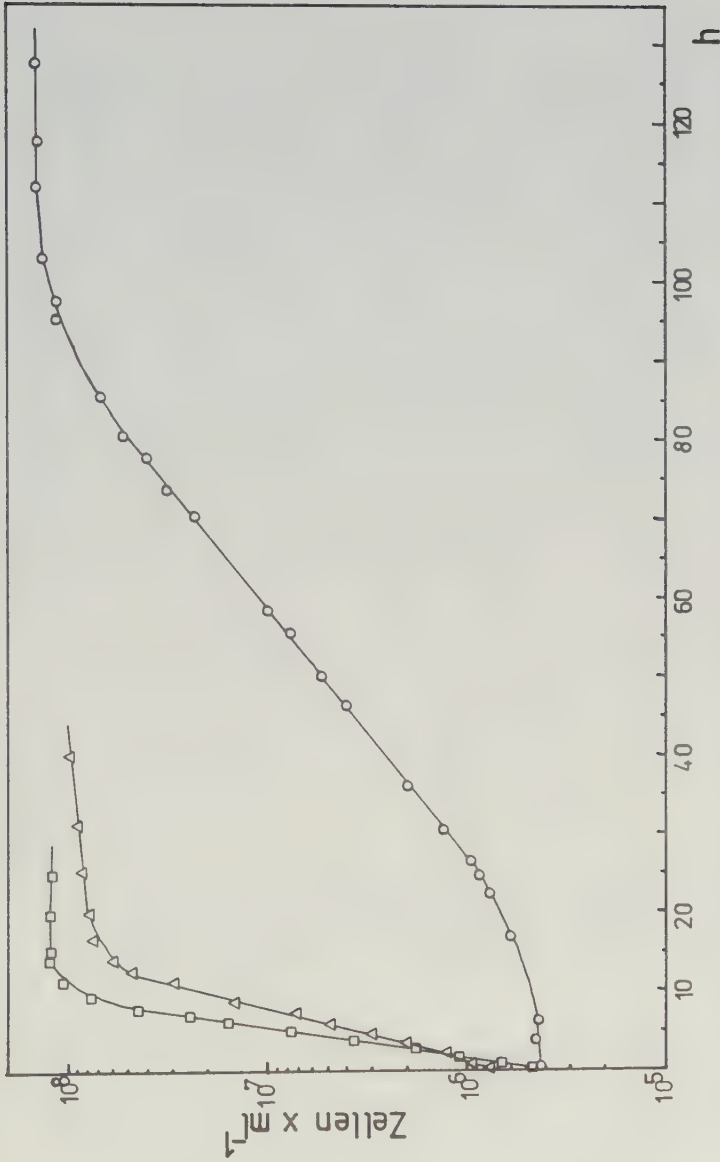


Abb. 15
Wachstumskurven von Hefezellen (Stamm R XII) in VM bei 10°C (○), bei 30°C (△),
und bei 40°C (□). Die Zellverdoppelungszeit t_d beträgt bei 10°C 9.5 h, bei
30°C 1.25 h und bei 40°C 1.7 h.

Die Analyse der Phospholipide und ihrer Fettsäuren sowie das Gesamtfettsäuremuster der verschiedenen Plasmamembranen ergab das in den Abbildungen 16 und 17 und in der Tabelle 4 zusammengefaßte Bild. Die Aufarbeitung der Plasmamembranen aus ganzen Hefezellen geschah so wie unter 3.1 beschrieben. So konnte erreicht werden, daß die Zellen auch noch während der Aufarbeitung zur Gewinnung der Plasmamembranen ihre Membranzusammensetzung aufgrund von Temperaturunterschieden nicht verändern, was innerhalb weniger Minuten vor sich gehen kann, wie Okuyama et al. (51, 52) kürzlich herausfanden.

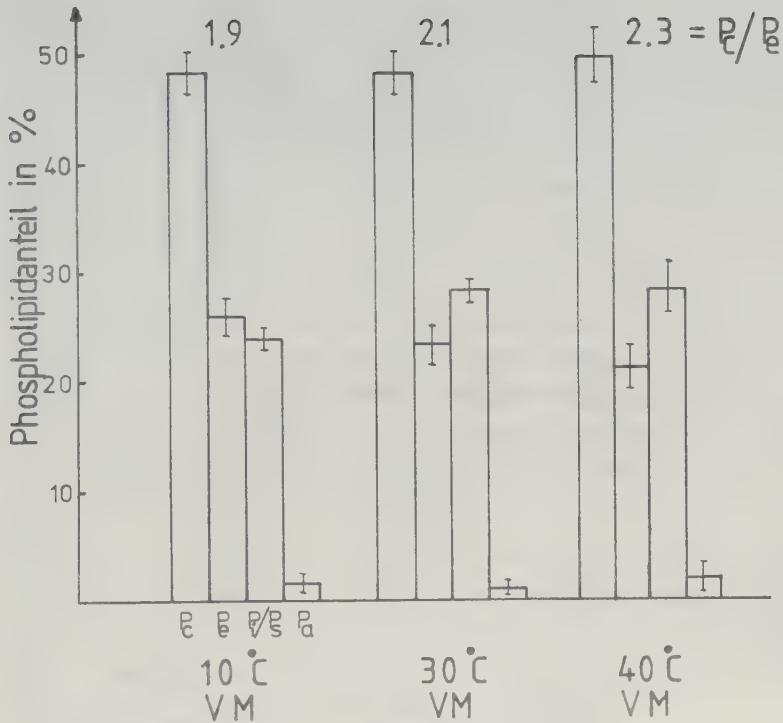


Abb. 16

Verteilung der Phospholipide in Plasmamembranen von Zellen, die bei unterschiedlichen Temperaturen aufgewachsen waren. Die Pfeile stellen die Standardabweichungen aus 8 bis 10 Aufarbeitungen dar.

Ein durch steigende Wachstumstemperaturen bedingter leichter Abfall beim Gehalt von PE wird erkennbar, ebenso ein leichter Anstieg des Anteils von PI/PS .

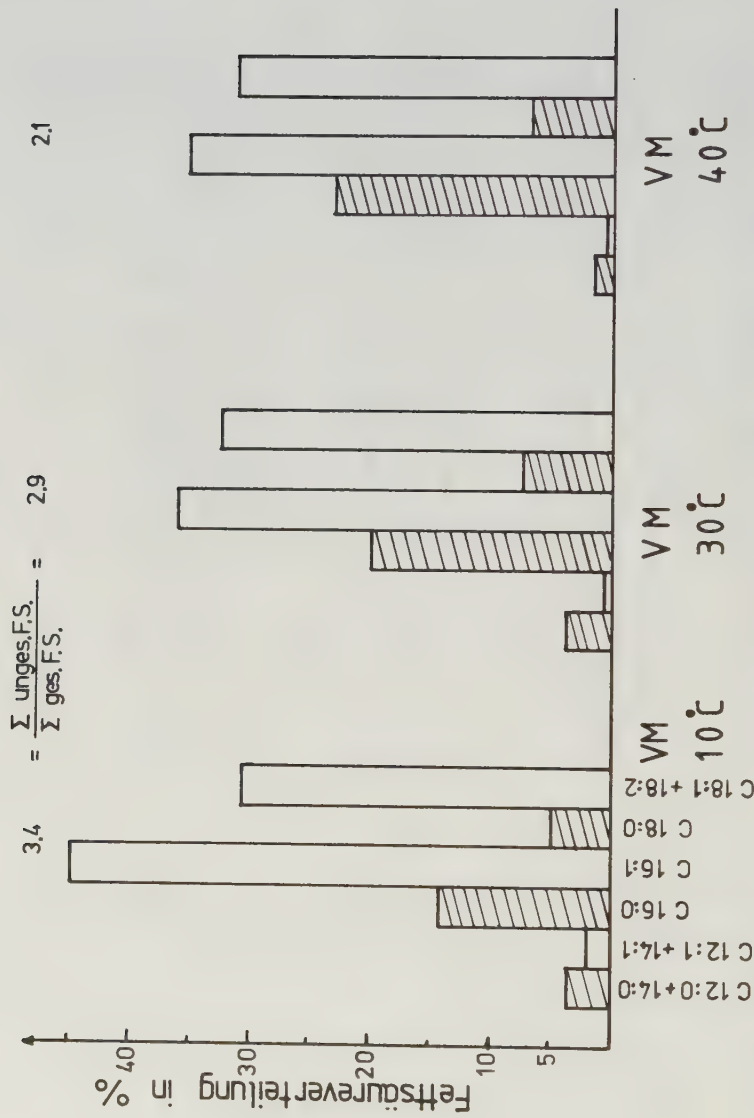


Abb. 17

Fettsäureverteilung im Gesamtlipidextrakt der verschiedenen Plasmamembranen.
Die Standardabweichungen waren in allen Fällen kleiner als 15 %.

Aus Abb. 17 wird ersichtlich, daß Hefezellen bei tiefen Wachstumstemperaturen erhöht Palmitoleinsäure in ihre Plasmamembranen einbauen, während bei 30°C oder bei 40°C erhöht gesättigte Fettsäuren verwendet werden. Dabei wird bevorzugt Palmitinsäure eingesetzt. Dadurch verschiebt sich der Sättigungsgrad der gesamten Fettsäuren. Bei steigenden Wachstumstemperaturen steigt auch der Anteil an gesättigten Fettsäuren, der in der Abbildung angegebene Quotient aus ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren sinkt deshalb und ist bei den 40°C-Zellen am kleinsten.

Für den Gesamtphosphat- und Sterolgehalt wurden die in Tabelle 3 dargestellten Werte ermittelt, die auf den Proteingehalt bezogen sind, damit sie vergleichbar wurden. Der Proteingehalt ist ebenfalls dargestellt.

	G E H A L T				A N
Wachstums- bedingungen	Protein mg/ml P ₃	Phosphat µg/mg Protein	Sterolen µg/mg Protein	Trockengewicht mg / ml P ₃	
10°C VM	1,4 ± 0,2	22,7 ± 6,2	121 ± 71	9,8 ± 0,9	
30°C VM	1,6 ± 0,3	29,0 ± 10,0	178 ± 52	9,1 ± 0,5	
40°C VM	1,5 ± 0,1	25,2 ± 13,1	135 ± 67	9,5 ± 1,5	

Tab. 3

Gesamtphosphat- und Sterolgehalt der Plasmamembranen aus Hefe, die bei unterschiedlichen Temperaturen gezüchtet worden waren (Daten aus 3 - 5 Messungen)

Auch hier ergeben sich, wie schon in Tabelle 2 gesehen, keine Unterschiede zwischen den Kulturen aus den verschiedenen Wachstumstemperaturen.

4.4. Einfluß der Wachstumsbedingungen der Hefe auf das Purintransportsystem

Anhand des Purintransportsystems, das von Forêt et al. (26) und Reichert et al. (59) gut untersucht worden war, wurde versucht, Zusammenhänge zu finden zwischen den Änderungen der Membranzusammensetzung, die durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Zellen erzielt wurden, und der Wirkungsweise eines in dieser Membran sich befindlichen Proteins. Dafür stehen in erster Linie zwei Parameter zur Verfügung, K_m , die Affinität des Transportsystems zu seinen Substraten, den Purinen, und V_{max} , die maximale Aufnahmegeschwindigkeit für diese Purine. Transportsysteme lassen sich nämlich prinzipiell gleich behandeln wie enzymatische Systeme (3). Voraussetzung dabei ist, daß bestimmte Bedingungen eingehalten werden, so z.B. daß die Konzentration der angebotenen Substrate innerhalb der Zelle praktisch gleich Null ist und daß das Substrat innen nicht gleich weiter umgesetzt wird. Auch sollte im steady state Bereich gearbeitet werden und die Substratkonzentration im Bereich des K_m -Wertes variiert werden.

Da die Fluidität von Membranen von der Umgebungstemperatur abhängt und durch Phasenübergänge von flüssig-kristallinen zum gel-Zustand bei einer bestimmten

Temperatur charakterisiert wird, wurde diese Temperatur ermittelt. Es ergab sich, daß die Phasenübergangstemperatur bei der Hefe bei 25°C liegt. Unterstützt wurde dieses Ergebnis durch ATPase-Untersuchungen, aus denen sich ebenfalls ein Phasenübergang bei 25°C abzeichnete (1). Deshalb wurden zunächst die kinetischen Parameter K_m und V_{max} des Purintransportsystems bei 15°C und 35°C bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt.

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, ergaben sich Unterschiede nur bei der kinetischen Konstanten V_{max} , so daß versucht wurde, die Temperaturabhängigkeit dieses Parameters bei den in SMC oder SME aufgezogenen Zellen zu ermitteln. Bei diesen Kulturen hatte sich ein relativ großer Unterschied in der Phospholipidzusammensetzung ergeben (siehe Abb. 21). Das Ergebnis ist in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt, weil bei der angewendeten Methode zur Bestimmung von V_{max} auch gleichzeitig die Bestimmung von K_m erfolgt.

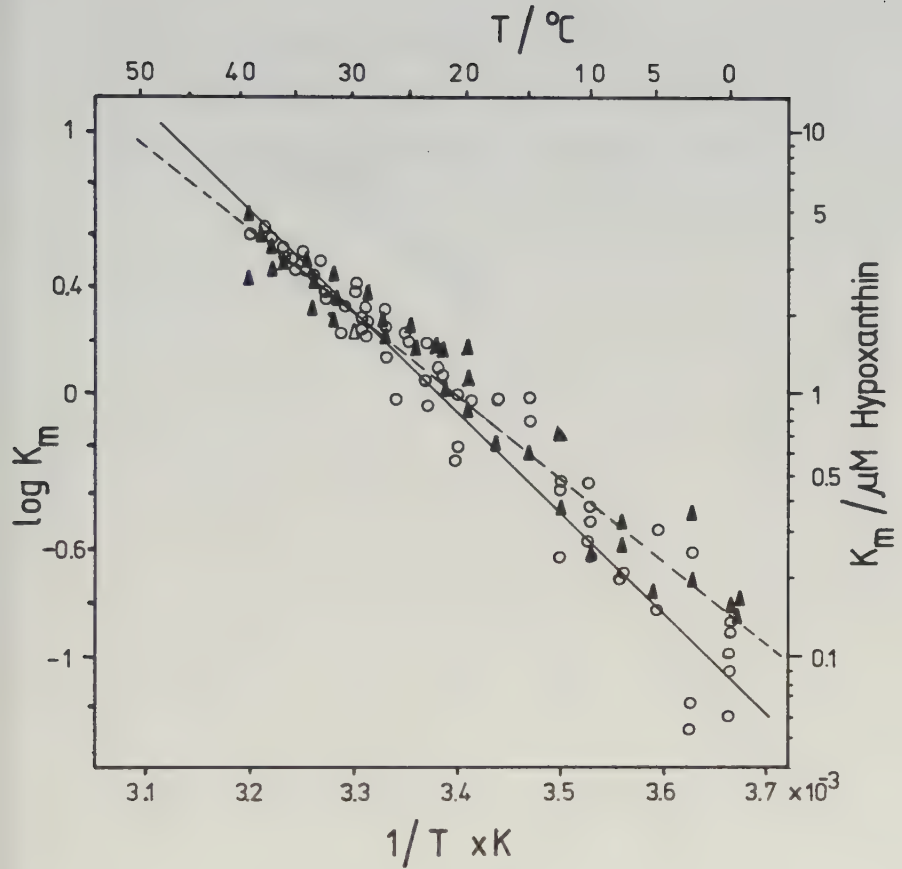


Abb. 18

Arrheniusdiagramm ($\log K_m$ gegen $1/T$) für K_m des Purintransportsystems mit Hypoxanthin als Substrat bei den Zellen aus SMC (O-O) oder aus SME (▲---▲). Es werden die Mittelwerte aus acht Einzelmessungen dargestellt.

Der linearen Temperaturabhängigkeit von K_m bei dieser Darstellung kann entnommen werden, daß, wie bei Ahlers & Peter (3) dargestellt, im untersuchten Temperaturbereich keine Änderung beim Erkennungsschritt eintritt.

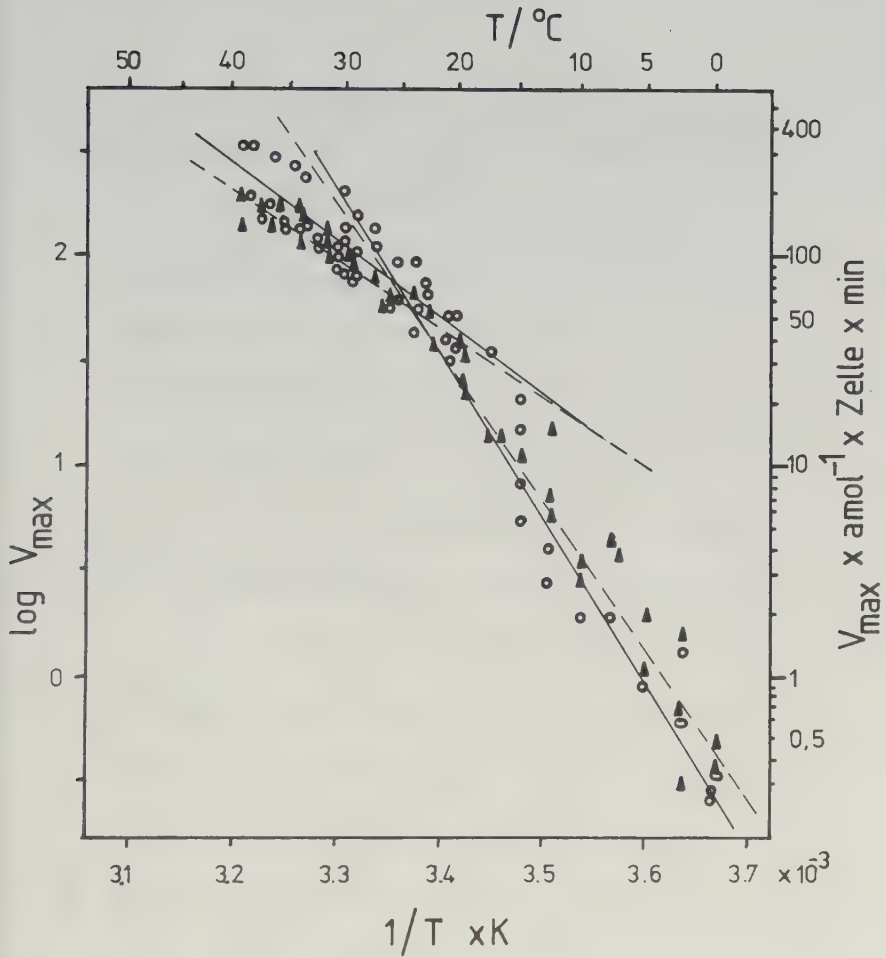


Abb. 19:

Arrheniusdiagramm ($\log V_{\text{max}}$ gegen $1/T$) für V_{max} des Purintransportsystems mit Hypoxanthin als Substrat für SMC-Zellen (O—O) und SME-Zellen (▲—▲). Es wurden Mittelwerte aus acht Einzelmessungen verwendet.

Deutlich zu erkennen ist die Änderung der Steigung der $V_{\max}$ -Geraden bei 25°C (Abb. 20). Allerdings sind bei den in verschiedenen Medien aufgewachsenen Zellen keine Unterschiede in Bezug auf diese Diskontinuität im Arrheniusdiagramm erkennbar. Offensichtlich hat die Supplementierung des Wachstumsmediums zwar einen Einfluß auf die Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung der Gesamtplasmamembran, aber diese Änderung wirkt sich in keiner meßbaren Weise auf das Transportsystem und seine kinetischen Parameter aus. Deshalb wurde versucht, eine drastischere Verschiebung des Phospholipidmusters und/oder der Fettsäurezusammensetzung zu erreichen.

Hierfür bot sich die anaerobe Anzucht an, da nach Andreassen & Stier (6, 7) unter O_2 -freien Wachstumsbedingungen Hefezellen für ungesättigte Fettsäuren und Sterole auxotroph werden. Damit wird über die Supplementierung des Nährmediums ein direkter Einfluß auf die Plasmamembranzusammensetzung genommen. Versuche mit anaerob gezogenen Zellen scheiterten jedoch, da aus apparativen Gründen nicht vollständig anaerob gearbeitet werden konnte (siehe auch 49), weil der verwendete Stickstoff noch Sauerstoff in Spuren enthielt. Diese Spuren werden offensichtlich sehr gut gebunden und ausgenutzt. Ähnliche Erfahrungen sammelte Prof. Fuhrmann (Marburg, pers. Mittei-

lung). Es wurde deshalb versuchsweise das Herbizid Paraquat eingesetzt, dessen peroxidierende Wirkung sich auf den Gehalt an ungesättigten Fettsäuren der Plasmamembran auswirken müßte. Diese Wirkung kann bei Bedarf mit Antioxidantien vollständig verhindert werden (27).

Paraquat wurde in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt, die das Wachstum der Hefezellen stark verlangsamt, ohne es jedoch zu stoppen (Abb. 20.).

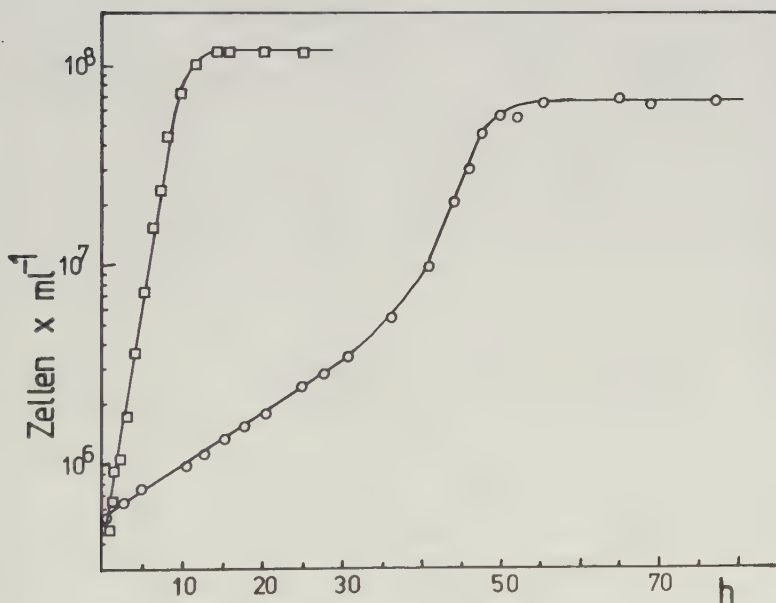


Abb. 20

Wachstumskurve von Hefezellen (Stamm R XII) bei Anwesenheit von 5 mM Paraquat in VM (O). Zum Vergleich die Kurve dieser Zellen in VM, ebenso bei 30°C (□).

Da dieses Herbizid sofort wirkt, wurden Hefezellen in VM bei 30°C gezüchtet, und nur zu den letzten zwei Zellteilungen (2h) wurde Paraquat 5 mM dazugegeben. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 21 und den Tabellen 4, 5 und 6 dargestellt. Diese Abbildung und Tabellen fassen noch einmal alle Ergebnisse mit sämtlichen Kulturen zusammen.

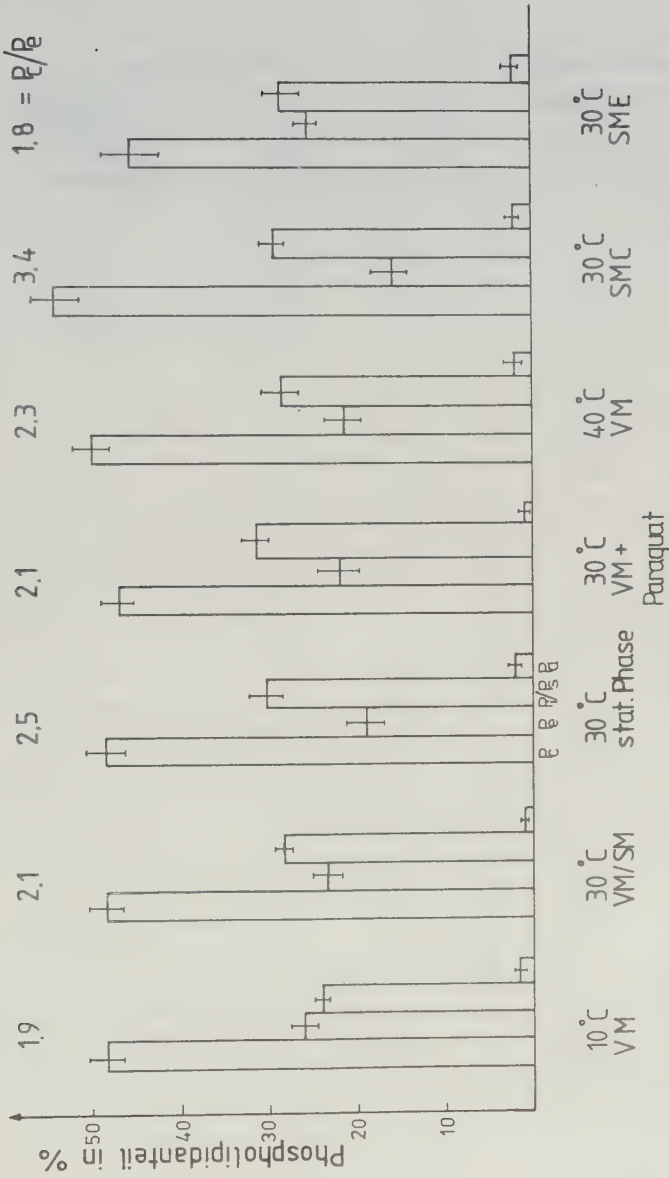


Abb. 21

Phospholipidmuster der Plasmamembranen aus Hefezellen, die unter unterschiedlichen Bedingungen aufgezogen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung (Pfeile aus 8 - 10 Plasmamembran-Aufarbeitungen).

Wachstums- bedingungen	Phospho- lipid	Kettenlängen- verteilung	Anteil an ungesättigten Fettsäuren			
			$\frac{C18\ (\%)}{C16\ (\%)}$	$\frac{C16 : 1}{C16 : 0}$	$\frac{C18:1+18:2}{C18:0}$	$\frac{\text{ungesättigte Fettsäuren}}{\text{gesättigte Fettsäuren}}$
10°C	Pc	0.5	4.9	6.9	4.5	
	Pi/Ps	0.8	0.5	2.9	1.3	
	Pe	0.6	2.4	7.5	3.6	
	P.L.	0.6	3.1	6.0	3.4	
30°C	Pc	0.7	2.6	6.3	3.7	
	Pi/Ps	0.8	0.8	2.2	1.3	
	Pe	0.7	1.5	6.0	3.2	
	P.L.	0.7	1.8	5.0	2.9	
30°C stat.Phase	Pc	0.7	3.0	6.0	4.0	
	Pi/Ps	1.1	0.8	3.5	1.6	
	Pe	0.7	1.8	9.0	3.5	
	P.L.	0.8	2.0	5.6	3.1	
30°C + 5 mM Paraquat	Pc	0.6	2.0	4.4	2.5	
	Pi/Ps	0.8	0.8	2.1	1.4	
	Pe	1.1	2.1	3.4	2.4	
	P.L.	0.75	1.6	3.4	2.1	

Wachstums- bedingungen	Phospho- lipid	Kettenlängen- verteilung	Anteil an ungesättigten Fettsäuren		
			$\frac{C18}{C16} (\%)$	$\frac{C16 : 1}{C16 : 0}$	$\frac{C18:1+18:2}{C18:0}$
					$\frac{\text{ungesättigte Fettsäuren}}{\text{gesättigte Fettsäuren}}$
40°C	Pc	0.6	1.8	5.6	2.5
	Pi/Ps	0.8	0.8	2.9	1.6
	Pe	0.8	1.7	3.8	2.1
P.L.		0.65	1.5	4.4	2.1
30°C + 1 mM Cholin- chlorid	Pc	0.6	2.8	6.9	3.5
	Pi/Ps	1.0	0.6	2.8	1.6
	Pe	0.7	1.9	8.1	3.8
P.L.		0.7	2.0	5.8	2.9
30°C + 1 mM Athanol- amin	Pc	0.7	3.3	5.9	4.0
	Pi/Ps	1.0	0.5	2.6	1.3
	Pe	0.5	1.2	4.3	2.0
P.L.		0.7	1.9	4.5	2.6

Tab. 4

Fettsäurezusammensetzung der Plasmamembranen von Hefezellen die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden und ihrer einzelnen Phospholipide. Die P.L.-Spalte stellt die Werte dar, die aus dem Plasmamembranextrakt gewonnen wurde, ohne die Phospholipide vorher dünn-schicht-chromatographisch voneinander zu trennen. Die Mittelwerte wurden aus 8 - 10 Plasmamembranaufbereitungen gebildet. Die Standardabweichung war in allen Fällen kleiner als 15 %.

Wachstumsbe- dingungen	G E H A L T			Trocken- gewicht
	Protein	Phosphat	Sterolen	
	mg/ml P ₃	µg/mg Protein	µg/mg Protein	
10°C VM	1,4 + 0,20	22,7 ± 6,2	121 ± 71	9,8 ± 0,9
30°C SM	1,9 ± 0,20	31,0 ± 12,0	167 ± 43	9,6 ± 0,4
30°C VM	1,6 ± 0,30	29,0 ± 10,0	178 ± 52	9,1 ± 0,5
30°C VM + Paraquat	1,1 ± 0,40	25,6 ± 7,2	27 ± 9	8,9
40°C VM	1,5 ± 0,10	25,2 ± 13,1	135 ± 67	9,5 ± 1,5
30°C SMC	0,8 ± 0,15	24,7 ± 10,7	251 ± 76	9,5 ± 0,6
30°C SME	1,4 ± 0,30	31,6 ± 13,7	204 ± 63	6,4 ± 0,4

Tab. 5

Zusammenstellung des Protein-, Phosphat- und Sterolgehaltes der Plasmamembranfraktionen und deren Trockengewicht. Es wurden 3 - 5 Bestimmungen, beim Protein 15 - 20 Bestimmungen durchgeführt (P₃ = Plasmamembranfraktion)

Wachstumsbe- dingungen	K_m (μM)		V_{max} $\left(\frac{10^{-18} \text{ Mol}}{\text{Zelle} \times \text{min.}} \right)$	
	15°C	35°C	15°C	35°C
30°C standard (SM, VM)	0.38 $\pm$ 0.04	2.3 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 1.1	100 $\pm$ 15
30°C VM + paraquat	0.71 $\pm$ 0.26	3.0 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.2	11 $\pm$ 2
30°C SMC	0.47 $\pm$ 0.10	3.2 $\pm$ 0.3	9.1 $\pm$ 3.5	203 $\pm$ 50
30°C SME	0.65 $\pm$ 0.05	3.3 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 1.2	126 $\pm$ 14
10°C VM	0.62 $\pm$ 0.10	4.1 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 3.0	191 $\pm$ 11
40°C VM	0.44 $\pm$ 0.07	2.8 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 1.2	107 $\pm$ 11

Tab. 6

Kinetische Parameter des Purintransportsystems von Hefe, die unter den angegebenen Bedingungen gezogen wurde. Die Daten mit Mittelwerten beruhen auf 7 - 10 Messungen.

Aus der Abbildung 21 ersieht man nur eine geringe Veränderung der Phospholipidverteilung bei den mit Paraquat behandelten Zellen. Aber bei den Daten aus der Tabelle 4 fällt auf, daß bei diesen Zellen ein höherer Anteil an gesättigten Fettsäuren bei fast gleicher Kettenlängenverteilung auftritt, verglichen mit

den Kontrollzellen. Aus Tabelle 6 kann ersehen werden, daß Paraquat einen starken Effekt auf $V_{\max}$ ohne Einfluß auf K_m zeigt.

5. DISKUSSION

5.1. Einfluß der Supplementierung des Wachstumsmediums mit Phospholipidvorstufen auf den Plasmamembranaufbau

Aus den in der Abbildung 13 dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, daß Supplementierung mit Cholinchlorid den Anteil von Pc an den Plasmamembranphospholipiden gegenüber dem Anteil von Pe signifikant steigen läßt. Bei Zugabe von Äthanolamin zum Wachstumsmedium steigt zwar der relative Anteil an Pe in der Plasmamembran der Hefe geringfügig, aber er ist kaum höher als bei den Kontrollzellen. Offenbar wird bei dem hier verwendeten Stamm R XII bevorzugt Pc auf Kosten von Pe eingebaut, ein Effekt, den man mit Hilfe der Zugabe von Cholinchlorid zum Medium stark fördern kann.

Daten aus	Phospholipid (in % des Gesamtphosphats)					
	Pc	Pe	Pi	Ps	Pa	Pc/Pe
Longley et al. (45)						
Zellmembranen	23	33	28		11	0.7
25°C						
Hunter & Rose (37)						
Extrakt aus ganzen						
Zellen	25	31	30	6	2	0.8
30°C						
Hossack et al. (36)						
+ Cholinchlorid	32	19	27		18	1.7
(Plasmamembranen)						
+ Äthanolamin	26	37	25		7	0.7
Rose & Harrison (60)						
Zellmembranen	44	22	22	4	-	2.0
30°C						
Aus Abb. 14						
30°C	48	23	28		-	2.1
SMC	54	16	29		-	3.4
SME	45	25	28		-	1.8

Tab. 9

Phospholipidverteilung in Membranen von Hefe, die von anderen Arbeitsgruppen in deren Veröffentlichungen beschrieben wurden.

Diese Ergebnisse gleichen denen von Rose & Harrison (60), die eine ähnliche Phospholipidverteilung mit geringen Mengen an Pa finden. Sie meinen, daß, wenn Pa gefunden wird, dieses als Abbauprodukt der anderen Phospholipide anzusehen ist, also auch durch die Aufarbeitungsmethode induziert werden könnte. Demgegenüber ermittelte Hossack et al. (36) eine andere Phospholipidverteilung mit höheren Pe- und Pa-Anteilen (Tab. 7). Dazu passen aber auch die Ergebnisse von Longley et al. (45) und Hunter & Rose (37). Die Unterschiede können wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, daß für diese Arbeiten andere Hefestämme untersucht wurden, die eine andere Membranzusammensetzung aufweisen und anders auf die Supplementierung des Mediums reagieren als der hier verwendete Stamm R XII. Aber die Tendenz, daß durch Zugabe von Cholinchlorid zum Medium der Anteil an Pc in der Plasmamembran erhöht werden kann, trifft auch auf den hier verwendeten Hefestamm zu. Die auch von mir beobachtete Tatsache, daß die Zellen, die in Cholinchlorid-haltigen Medien gezogen wurden, während der Sphaeroplastenherstellung fragiler sind als die Kontrollzellen, erklären Hossack et al. (36) damit, daß Pc einen höheren sterischen Raumbedarf als Pe besitzt. Deshalb sollen die Membranen bei einem höheren prozentualen Anteil an Pc labiler sein, wenn nicht durch den Einbau

anderer Stabilisatormoleküle dieser Effekt ausgeglichen werden kann. Van Deenen (18) zeigt demgegenüber, daß bei künstlichen Membranen Pc sehr gut aggregiert und durchaus stabile Membranen bilden kann, die auch noch nach kurzer Behandlung mit Phospholipasen (Andauung) erhalten bleiben. Wahrscheinlich ist diese beobachtbare Fragilität der Sphaeroplasten aus Cholinchlorid-Medien nicht ausschließlich in dem sterisch größeren Kopfmolekül des Pc begründet, sondern liegt eventuell auch an der Gesamtzusammensetzung der Fettsäuren.

Der Quotient aus ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren der gesamten Fettsäuren (letzte Spalte in Tab. 4) ist bei den einzelnen Supplementierungen ähnlich. Aber er ist bei mit Cholinchlorid ergänzten Zellen zwar gleich dem der Kontrollzellen, aber etwas größer als der, den die mit Äthanolamin-haltigen Medium gezogenen Zellen aufweisen (Abb. 14 und Tab. 4). Ein kontrastreiches Bild zeigt der Quotient bei den Fettsäuren der einzelnen Phospholipide. Es fällt auf, daß bei den Cholinchlorid-Zellen entgegen dem allgemein beobachtbaren Trend der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Phospholipide die Fettsäuren des Pe relativ stärker ungesättigt vorliegen als die des Pc. Das ist hauptsächlich bei den C 18-Fettsäuren, der Gruppe der Stearinsäure der Fall, wo normalerweise

eine Verteilung von 5 - 6 ungesättigte Fettsäuren auf eine gesättigte Fettsäure kommen. Bei den Äthanolamin-Zellen liegt eine ähnliche Verteilung der Fettsäuren von Pc vor. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren ist beim Pe jedoch höher als bei den 30°C Zellen oder den Cholin-Zellen. Beim Vergleich des Sättigungsgrades der Fettsäuren beider Phospholipide der Äthanolamin-Zellen erkennt man, daß im Pc gegenüber Pe ein doppelt so hoher Anteil an ungesättigten Fettsäuren vorliegt. Dieser starke Unterschied wird bei keiner anderen Zellkultur erreicht.

Auffallend ist der hohe Anteil an gesättigten Fettsäuren im Pi/Ps. Die beiden Phospholipide Pi und Ps konnten dünn-schichtchromatographisch nicht aufgetrennt werden. Rose & Harrison (60) geben jedoch Werte von 22 % für Pi und 4 % für Ps bei Plasmamembranen von *S. cerevisiae* an (Tab. 7). Da also 85 % des Phospholipid-Fleckens auf der Dünnschichtplatte Pi darstellt, soll bei der weiteren Diskussion nur noch von Pi die Rede sein, mit der hier dargestellten Einschränkung.

Ganz generell gilt, daß in Pi der Hauptanteil der gesättigten Fettsäuren vorliegt. Verglichen mit den beiden anderen Phospholipiden ist hier ein höherer Anteil an C 18-Fettsäuren zu erkennen. Pi scheint von den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen völlig unbeein-

flußbar zu sein und weist einen sehr konstanten Fettsäuregehalt in relativ konstanter Zusammensetzung auf. Das erkennt man auch anhand der Abbildungen 13 und 21 beim prozentualen Anteil von Pi an der Phospholipidverteilung der Plasmamembranen.

Die geschilderten Ergebnisse stehen im Einklang mit denen aus anderen Arbeitsgruppen (36, 45, 80), die ähnliche Auswirkungen von Wachstumsbedingungen auf die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide fanden und ebenso die Fettsäureverteilung innerhalb der einzelnen Phospholipide als unterschiedlich aber spezifisch erkannten.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen auf, daß die Supplementierung des Wachstumsmediums mit Äthanolamin eine größere Auswirkung auf die Fettsäurezusammensetzung der Plasmamembranen von Hefezellen hat als diejenige mit Cholinchlorid. Auf der anderen Seite wird das Phospholipidmuster durch die Cholinchlorid-Ergänzung der Medien stärker verschoben. Uehara et al. (78) weisen darauf hin, daß Pe sich sehr viel dichter packen läßt als andere Phospholipide (33) und somit die Membran kompakter werden läßt. Das trägt auch zur Asymmetrie von Membranen bei, indem eine ungleiche Verteilung der einzelnen Phospholipide, in die-

sem Falle Pe, der Außen- oder Innenschicht eine unterschiedliche Packungsdichte erzielt. Diesen Effekt von Pe kann die Zelle durch den Einbau von Sterolen, Cardiolipin oder ungesättigten Fettsäuren ausgleichen. Auch Cullis & McLaughlin (17) finden mit Hilfe der Phosphor-NMR-Spektroskopie, daß sich Pe durch die kleinere Kopfgruppe dichter packen läßt. Das zeigt sich daran, daß Pe-Vesikel einen geringeren Durchmesser aufweisen als Pc-Vesikel, wenn gleich viele Moleküle Pe bzw. Pc eingesetzt werden. Das sei, so argumentieren sie, eventuell ein Hinweis, weshalb man Pe in höheren Mengen auf der Membranninnenseite wiederfindet als auf der Membranaußenseite. Zu diesen Betrachtungen passen auch die geschilderten eigenen Beobachtungen bei der Sphaeroplastenherstellung. Äthanolamin-Zellen waren dabei viel stabiler, Cholinchlorid-Zellen viel fragiler als die Kontrollzellen. Bei der Betrachtung der Fettsäurezusammensetzung fällt die Ähnlichkeit der Cholinchlorid-Zellen mit derjenigen der Kontrollzellen auf. Das bedeutet, daß die beobachtete Fragilität nur durch die Phospholipid-Kopfgruppe und nicht durch die Fettsäurezusammensetzung bewirkt wird.

Zusammenfassend kann man postulieren, daß die Regulation der Fluidität der Plasmamembranen beim hier

verwendeten Hefestamm über die C-18-Fettsäuren stattfindet, wobei auch der geringe Anteil an Linolsäure (C 18:2) eine gewisse Rolle spielen könnte. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob nicht die Palmitinsäure (C 16:0), in der Membran ausgerichtet, genauso lang wie die Ölsäure (C 18:1) oder die Linolsäure als Molekül sei (Prof. Büldt, Berlin pers. Mitteilung), und somit die Zelle für den Einbau von ungesättigten Fettsäuren die längerkettigen Öl- und Linolsäuren auswählt. Damit wird der Querschnitt der Membran erhalten und trotzdem kann die Fluidität dieser Membran verändert und angepaßt werden.

5.2. Untersuchung zur Funktion der Plasmamembran nach Supplementierung der Wachstumsmedien mit Äthanolamin oder Cholinchlorid

Die im Membranaufbau gefundenen Unterschiede, nämlich Änderung im Anteil an Pc und Verschiebungen im Sättigungsgrad der Fettsäuren, führten zur Untersuchung einer Funktion dieser Membranen, dem Purintransportsystem. Das geschah in zwei Schritten; zunächst wurde in einem Vortest ermittelt, ob sich Unterschiede bei den kinetischen Parametern zeigen.

würden. Aus der Tabelle 6 ersieht man, daß die Werte für $V_{\max}$ der mit Cholinchlorid supplementierten He-fezellen sehr stark streuen gegenüber den $V_{\max}$ -Werten der anderen Zellen. Das läßt eine Störung des Membransystems vermuten, die in Inhomogenitäten eines Lipid-microenvironments begründet liegen könnte. Sandermann (62) zeigt auf, daß polare Gruppen der Phospholipide sich abstoßen und dies gerade beim Pc besonders stark der Fall sei. Somit würde eine Anhäufung von Pc die Membranfluidität erhöhen. Davon müßten auch die microenvironments verschiedener Membransysteme betroffen sein. Wie Hossack et al. (36) und Siminovitch et al. (67) in ihren Veröffentlichungen zeigen, hat Pc als Molekül einen größeren Raumbedarf, weshalb die Membran nicht mehr so dicht gepackt ist und auch für größere Moleküle, wie z.B. für Purine, besser durchlässig wird. Dem stehen jedoch andererseits die hier ermittelten Daten für die Fettsäurezusammensetzung entgegen, die eine solche Streuung der Werte nicht zulassen.

Wie aus den Abbildungen 18 und 19 und der Tabelle 6 hervorgeht, ist zwar eine exponentielle Steigerung von K_m und $V_{\max}$ bei steigenden Inkubationstemperaturen zu erkennen, aber es können keine Unterschiede zwischen den verschieden aufgezogenen Zellen festgestellt werden. Im Arrheniusdiagramm für $V_{\max}$ ist eine

Steigungsänderung der Geraden zu erkennen. Aus den Steigungen der beiden Geraden kann die jeweils erforderliche Aktivierungsenergie des Purintransportes ermittelt werden. Die beiden Geraden schneiden sich in einem Temperaturbereich um 25°C. Diese Temperatur wird allgemein als Phasenumwandlungstemperatur der Membran diskutiert (14, 30, 34, 39, 81, 88). Allerdings zeigen Londesborough (44) und Silvius et al. (66), daß nicht nur Änderungen der Membranfluidität einen Einfluß auf $V_{\max}$ haben, sondern auch wenn andere Teilschritte des kinetischen Umsatzes geschwindigkeitsbestimmend werden. Konformationsänderungen der Proteine, induziert durch die umgebenden Phospholipide, werden ebenso dafür verantwortlich gemacht, daß Knicke im Geradenverlauf im Arrheniusdiagramm auftreten (14, 24, 34, 42, 46). Heremans & Wuytack (34) finden z.B. an sarkoplasmatischer Ca^{2+} -ATPase aus Kaninchenmuskel, daß die Aktivierungsenergie dieses Proteins von dem Druck der umgebenden Phospholipide abhängt.

Parallel zu diesen Versuchen zeigten Ahlers et al. (2) an einem anderen Membransystem, der Mg^{2+} -abhängigen ATPase, mit Hilfe von kinetischen Messungen und in kalorimetrischen Thermogrammen (DSC) von Plasmamembranen, daß in diesem Temperaturbereich von 25°C ein Phasenumwandlungspunkt ebenso zu erkennen ist. In

diesem Bereich geht die Membran vom flüssig-kristallinen in den gel-Zustand über. Ahlers (4) konnte zusätzlich zeigen, daß dieser Knick im Arrheniusdiagramm beim Einsatz eines milden Detergens verschwindet. Ähnliche Ergebnisse mit Detergentien haben auch Brasitus & Schachter (11) gefunden. Die Anwendung dieser Detergentien sollte auch bei dem hier untersuchten Purintransport zu ähnlichen Ergebnissen führen. Diese Versuche sind aber weitaus schwieriger durchzuführen, da bei der Untersuchungsmethode mit ganzen noch lebenden Zellen gearbeitet werden muß.

5.3. Der Einfluß der Wachstumstemperatur auf die Plasmamembranzusammensetzung von Hefezellen

Da die Supplementierungsversuche nicht die erwarteten starken Unterschiede im Aufbau und der Funktion der Plasmamembranen aufzeigten, wurde versucht, Hefezellen bei Grenztemperaturen aufzuziehen. Hefezellen wachsen gerade noch bei 40°C und bei 7°C, so daß Aufzucht bei diesen Temperaturen Unterschiede in der Membranzusammensetzung induzieren sollte. Aus apparativen Gründen wurden jedoch Zellen bei 10°C gezogen, da Kontrollversuche keinen meßbaren Unterschied

zwischen bei 7°C und 10°C gezüchteten Zellen erbrachten (Abb. 16).

In der Phospholipidzusammensetzung ergaben sich nur geringfügige Unterschiede (Abb. 16 und 21). Bei 40°C weisen die Zellen einen leicht erhöhten Gehalt an Pc auf. Interessant ist das Verhältnis von Pe zu Pi, das bei den 10°C-Zellen noch bei 1.1 liegt, bei den 30°C-Zellen schon kleiner als 1 ist und bei den 40°C-Zellen 0.76 beträgt. Das heißt, es liegt mehr Pi vor als Pe, je höher die Wachstumstemperatur wird. Wie schon unter 5.1 diskutiert, zeigt sich auch hier, daß offensichtlich nicht der Gehalt an Pc oder Pe für die Regulation der Membranfluidität wichtig zu sein scheint, sondern eher das Phospholipid Pi. Wie unter 5.1 beschrieben, findet man bei diesem Phospholipid den größten Anteil an gesättigten Fettsäuren verglichen mit dem der anderen Phospholipide. So müßte sich ein sich verändernder Pi-Gehalt auch auf die Fettsäurezusammensetzung auswirken. Es soll noch einmal darauf verwiesen werden, daß in dieser Arbeit Pi nicht von Ps getrennt werden konnte, weshalb diese Aussagen nur eingeschränkt für Pi gelten (siehe S. 79).

Die Fettsäuren setzen sich hauptsächlich aus Palmitin/Palmitoleinsäuren, den Stearinsäuren und deren ungesättigten Molekülen zusammen. Die Verteilung des Sättigungsgrades allerdings ist unterschiedlich

und hängt stark von der Wachstumstemperatur ab (Abb. 17 und Tab. 4). Die bei 10°C aufgezogenen Zellen weisen einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren auf verglichen mit den Kontrollzellen. Bei 40°C gewachsene Zellen zeigen dementsprechend einen höheren Gehalt an gesättigten Säuren auf. Bei ihren C 16-Fettsäuren liegt ein doppelt so hoher Sättigungsgrad vor verglichen mit den bei 10°C gewachsenen Zellen und ebenso in den C 18-Fettsäuren sind sie deutlich gesättigter als die Kontrollzellen oder die 10°C-Zellen.

Bei den 10°C-Zellen ist die Sättigung der C 16-Fettsäuren geringer als bei den anderen Zellen. Allgemein gilt für Hefe, daß die C 18-Fettsäuren einen höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aufweisen als die C 16-Fettsäuren. Bemerkenswert ist noch die Tatsache, daß sich die 10°C-Zellen nur in dem höheren Gehalt an Palmitoleinsäure (C 16:1) von den bei 30°C gezüchteten Zellen unterscheiden, denn der Sättigungsgrad in den C 18-Fettsäuren ist bei beiden Kulturen annähernd gleich. Zusätzlich kommt noch ein geringfügig höherer Anteil an C 16-Fettsäuren hinzu.

Diese deutlichen Unterschiede sind nicht nur bei der Analyse der Gesamtplasmamembranfraktion zu erkennen, sondern werden auch bei den einzelnen Phos-

pholipiden wiedergefunden. Nur bei den 10°C-Zellen findet man starke Unterschiede in der Kettenlänge der Fettsäuren der einzelnen Phospholipide. Bei den anderen beiden Zellkulturen sind die Unterschiede nicht so groß. Auch hier findet sich wieder, daß im Pc der höchste Anteil von ungesättigten Fettsäuren vorliegt, während im Pi hauptsächlich die gesättigten Fettsäuren eingebaut werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse gleichen den bei den verschiedenen Supplementierungen erhaltenen Daten (siehe unter 5.1). Die durch die verschiedenen Wachstumstemperaturen bedingten Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung stehen ebenso im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Daten (5, 20, 38, 51 - 53, 65, 76, 77, 80, 88). So stellt Sinensky (68) dar, daß durch Temperaturerniedrigung die Sättigung der Membranfettsäuren verringert und damit die Membran in Bezug auf ihre physikochemischen Eigenschaften konstant gehalten wird. Merkel & Perry (47) finden, daß die Phospholipidfettsäuren von gram-negativen thermophilen Bakterien einen höheren Schmelzpunkt haben, wenn die Bakterien in einem Acetat - statt Glucose-haltigen Wachstumsmedium kultiviert werden, in dem sie bei noch höheren Temperaturen wachsen können.

Demgegenüber fanden Hunter & Rose (38) keine Unter-

schiede in den Fettsäuren der Membranen, wenn Hefezellen bei 30°C oder bei 15°C gezogen wurden. Andere Untersuchungen am gleichen Organismus von Okuyama et al. (52) zeigen aber einen erhöhten Einbau von ungesättigten Fettsäuren in Membranen bei Senkung der Umgebungstemperatur von 35°C auf 10°C sowohl bei in vitro als auch bei in vivo Versuchen. Diese Unterschiede liegen zum Teil daran, daß ein anderer Hefestamm eingesetzt wurde, aber auch an den Versuchsbedingungen. Okuyama et al. haben nur kurzfristig Änderungen der Fettsäuresynthese gemessen, während Hunter & Rose länger kultivierte Zellen aus batch oder Chemostat-Kulturen verwendeten. Die in der Abbildung 21 und Tabelle 4 zusammengefaßten Ergebnisse, die eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung durch Paraquat in Bezug nur auf deren Sättigungsgrad zeigen, entsprechen der Erwartung, daß dieses Herbizid durch seine peroxidierende Wirkung einen Einfluß auf die Fettsäuresättigung haben sollte, nicht aber auf die Phospholipidzusammensetzung. Erst wenn Paraquat reduziert in der Zelle vorliegt kann es mit molekularem Sauerstoff reagieren und entfaltet dann, so Dodge (21), seine peroxidierende Wirkung. Es erzeugt bei seiner Reoxidation O-, OH- und H₂O-Radikale, die die eigentlichen Reaktanden sind. In jeder Zelle sind für die

Entgiftung dieser Radikale Enzymsysteme vorhanden (Katalasen, Superoxid-dismutasen, Peroxidasen), die aber im Normalfall nur in geringen Konzentrationen vorliegen. Bei Erscheinen von größeren Mengen von Radikalen müssen diese Enzymsysteme induziert und synthetisiert werden. Dieser Prozeß kann bei plötzlicher Zugabe von Paraquat völlig überfordert werden, so daß dieses Herbizid in so einem Fall zur Zellschädigung führt. Dafür muß aber genügend Sauerstoff vorliegen. Deshalb wirkt Paraquat bei anaeroben Zellen nicht.

Schon Pryor (56) hat die Wirkung von Paraquat auf Kohlenwasserstoffe und andere biologisch wichtigen Moleküle beschrieben. Hassan und Fridovitch (27, 32) setzten es bei *E. coli* ein, fanden aber nur dann eine toxische Wirkung, wenn die Zelle ein reduzierendes Agens für die Reduktion von Paraquat bereithält. In diesem Fall tritt die Wirkung aber erst nach ca 7 h ein, dem 14fachen einer Zellverdopplungszeit. Bei den hier dargestellten Untersuchungen wurde Paraquat nur für zwei Stunden den Zellkulturen zugesetzt, also für die Dauer von ein bis eineinhalb Zellteilungen und dennoch wurden Auswirkungen auf die Plasmamembranzusammensetzung sichtbar. Da aber auch die Phospholipid-synthetisierenden Enzyme in dieser Membran sitzen, kann nicht ausgeschlossen wer-

den, daß diese durch Paraquat geschädigt werden. Damit würde eine Neusynthese von Phospholipiden sehr eingeschränkt. Dafür spricht das Ergebnis der Fettsäuren-Untersuchung. Offenbar war es der Zelle nicht mehr möglich, den Fettsäure-Sättigungsgrad aufrecht zu erhalten. Über längere Zeit eingesetzt sollte Paraquat auch das Phospholipidmuster der Plasmamembranen verändern, da die Hefezellen eine solche Behandlung überleben (siehe Abb. 20). Nach Autor (9) besitzen auch Hefezellen Superoxiddismutasen, die offensichtlich induziert werden und dann ein fast normales Wachstum der Hefezellen ermöglichen (2. Teil der Wachstumskurve in Abb. 20, nach ca. 40 h).

Die Ergebnisse der Phosphatbestimmungen zeigen auf, daß sich der Phospholipidgehalt der Membranen durch die angewandten Wachstumsbedingungen nicht verändern läßt. Rose et al. (60) finden einen Gehalt an Phospholipiden von 5 % vom Zelltrockengewicht. Die hier dargestellten Ergebnisse ergeben nur einen Gehalt von 0.6 %, allerdings vom Plasmamembranen-Trockengewicht. Der Unterschied liegt zum einen an der Trockengewichtsbestimmung, zum anderen aber auch daran, daß Rose et al. den Phospholipidgehalt von der Gesamtzellmembranfraktion angeben.

Beim Sterolgehalt sind Auswirkungen der Wachstumsbedingungen zu erkennen. Nach Nurminen (50) und Rose

und Harrison (60) ist Ergosterol das wichtigste Sterol der Hefemembran. Die in SMC gezogenen Zellen müssen mehr Ergosterol einbauen, um die Fluidität der Plasmamembranen für eine optimale Funktion zu erhalten. Unerwartet gering fällt dagegen der Sterolgehalt bei den Paraquat-Zellen aus. Dieses Ergebnis muß aber sehr vorsichtig interpretiert werden und gilt nur vorläufig, da nur drei Meßwerte zur Verfügung stehen. Es konnte kein Paraquat mehr bezogen werden. Eigentlich sollte ein erhöhter Sterolgehalt vorgefunden werden, da der Sättigungsgrad der Fettsäuren durch die Paraquat-Behandlung erhöht wird gegenüber den Kontrollzellen, und die Membran damit weniger flüssig wird. Unterhalb des Membran-Phasenumwandlungspunktes, der durch gesättigte Fettsäuren erhöht wird, wirken Sterole verflüssigend (65). Rose und Harrison (60) finden in Hefemembranen einen Sterolgehalt von 0.1 bis 1 % des Zelltrockengewichts gegenüber 0.3 bis 3 % in der vorliegenden Arbeit. Dieser Prozentsatz bezieht sich aber auf das Trockengewicht der isolierten Plasmamembranen.

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, daß Hefezellen auf niedrige Wachstumstemperaturen mit einem höheren Anteil an kürzerkettigen und ungesättigten Fettsäuren in ihren Plasmamembranen reagieren,

während höhere Temperaturen den entgegengesetzten Effekt erzielen. Die Erniedrigung der Wachstumstemperatur hat in Bezug auf die Fettsäurezusammensetzung die größere Veränderung bewirkt als die Erhöhung der Temperatur. Daß dieser Effekt aber nicht an der verringerten Wachstumsrate liegt, konnten schon Hunter und Rose (38) zeigen. Zusätzlich wird durch peroxidierende Substanzen (hier Paraquat) das Fettsäuremuster in Richtung auf einen höheren Sättigungsgrad verschoben.

5.4. Untersuchungen zur Funktion der Plasmamembranen von bei verschiedenen Temperaturen gezogenen Zellen

Die durch die unterschiedlichen Wachstumstemperaturen manipulierten Hefezellen wurden auf ihre Funktion anhand des Purintransportsystems hin getestet. Aus den in der Tabelle 6 dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, daß sich die Anzucht bei 10°C neben der Behandlung der Zellen mit Paraquat am stärksten auf den Purintransport auswirkt. Zwar ist K_m nur geringfügig verändert, aber die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} ist deutlich höher als bei den 30°C-Zellen. Dieser Unterschied kann gut mit der Membran-

fluidität erklärt werden, da beide Inkubationstemperaturen weit über der Anzuchtstemperatur der 10°C-Zellen liegen. Nach Friedman (28) und Friedman & Glick (29) liegt der Phasenumwandlungspunkt der natürlichen Membran unterhalb, nach Sanderman (62) gerade bei der Wachstumstemperatur. Somit können bereits geringe Veränderungen an dem Verhältnis ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren (51), des Phospholipid-Musters (34, 65), oder an den Wechselwirkungen von Ionen mit den Phospholipiden (70) zu gravierenden Veränderungen der Fluidität und damit der Funktion der Membran führen.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit denen von unter Cholinchlorid-Ergänzung gezüchteten Zellen (5.2) fällt auf, daß ähnliche $V_{\max}$ -Werte bei 35°C erreicht werden, jedoch streuen die Werte der Cholinchlorid-Zellen viel stärker. Deren $V_{\max}$ -Werte bei 15°C decken sich aber im Gegensatz zu den 10°C-Zellen mit denen aus den anderen Kulturen, mit Ausnahme der Paraquat-Zellen. Das mag daran liegen, daß die 10°C-Zellen aufgrund der Anzuchttemperatur ihre Membranen bereits im gel-Zustand vorliegen haben, weshalb der Purintransport doppelt so schnell wie bei den anderen Kulturen verlaufen kann. Möglicherweise sind die Membranen bei diesen Zellen auch ziemlich stabil, jedenfalls sta-

biler als diejenigen der Cholinchlorid-Zellen mit ihrem relativ erhöhten Pc-Anteil. Außerdem könnte eine Behinderung der Erkennungs- und Transportvorgänge durch die polaren, negativ geladenen Phospholipid-Kopfgruppen des Cholins eine entscheidende Rolle spielen (62). Der Erkennungsvorgang, der sich im K_m widerspiegelt, ist aber in diesem Fall nicht behindert. Ahlers in (74) zeigt anhand kinetischer Messungen an der Mg^{2+} -ATPase aus Hefe, daß Phospholipide einen Einfluß auf den kinetischen Parameter K_s haben. Aber auch der Gehalt an gesättigten Fettsäuren beeinflusst die Parameter, so wird z.B. K_i größer, wenn der Sättigungsgrad der Fettsäuren in der Membran steigt.

Die Ergebnisse der mit Paraquat gezüchteten Hefezellen bestätigen die Überlegungen, daß die Membranfluidität einen Einfluß auf die Purinaufnahme hat. Durch den höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren ohne Veränderungen ihrer Kettenlänge wird die Membranfluidität herabgesetzt. Dadurch könnte der Translokationsschritt beim Purintransport behindert werden, die V_{max} -Werte fielen sehr viel niedriger aus als bei den Kontrollzellen. Sogar die Anzucht bei 40°C hat nicht diesen starken Effekt auf den Transportvorgang. Kontrollversuche erbrachten keine Beeinflussung der Aufnahme durch die Anwesenheit von Paraquat

im Aufnahmemedium, so daß der Effekt auf $V_{\max}$ nur über die Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen kommen kann.

Ähnliche Zusammenhänge zwischen Wachstumstemperaturen und Membranfunktionen wurden bei Hefe (57, 81, 83), bei Karpfen (85, 86), Rattenadipocyten (5), Goldfischen (76), bei *Bacterium amyloliquefaciens* (53), bei *Tetrahymena* (88) und bei *Acholeplasma* (43) vorgestellt. Immer wieder wird dabei betont, daß nur die Membranfluidität die Aktivität der membrangebundenen Enzyme beeinflusst. Meistens aber wird dabei nicht die Fluidität der Gesamtmembran angesprochen, sondern die des microenvironments. Dabei wird davon ausgegangen, daß ein Membranenzym von einem Ring von Phospholipiden, den "annular phospholipids" (62), umgeben ist, die für die Aktivität dieses Enzyms essentiell sind. Das bedeutet aber, da bei Lipidbestimmungen die Gesamtheit der Membran erfaßt wird, daß Änderungen in der Zusammensetzung zwar erkannt werden können, aber kein Rückschluß möglich ist, ob sich das betreffende microenvironment in seiner Lipidzusammensetzung verändert hat. Die Fluidität der Gesamtmembran kann sich also massiv ändern, ohne daß das microenvironment in seiner Zusammensetzung verändert werden würde. In diesem Fall kann kein Effekt der Membranfluiditätsänderung auf die Aktivi-

tät von Membranenzymen festgestellt werden. An das Problem käme man nur heran, wenn es gelänge, dieses microenvironment in seiner Zusammensetzung zu erfassen und mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern seine Fluidität in situ zu messen. Mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden konnte nur die Zusammensetzung der Gesamtplasmamembran erfaßt werden. Auch bei den angeführten Untersuchungen wurde das microenvironment nie bestimmt. Ebenso werden in den seltensten Fällen kinetische Messungen der verschiedenen Parameter durchgeführt. So kann nie entschieden werden, wie sich die Membranfluidität auf welche Teilschritte des kinetischen Umsatzes auswirkt. Auch in dieser Arbeit kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei $V_{\max}$ immer nur der gleiche Teilschritt geschwindigkeitsbestimmend bleibt. Forêt et al. (26) gehen dabei von sechs Schritten aus, die allerdings nicht getrennt voneinander untersucht werden können. Erst wenn dieses Transportsystem in isolierter, reiner und noch aktiver Form vorliegt, wäre eine genauere Untersuchung möglich. Arbeiten dazu sind schon im Gange (Dr. R. Schmidt, pers. Mitteilung). So bleibt hier vorerst die Frage von Londesborough (44) nach genauer Charakterisierung der Knicke im Arrheniusdiagramm und Zuordnung zu den kinetischen Teilschritten offen. Davon abgesehen bieten sich noch Untersuchun-

gen der Temperaturabhängigkeit der kinetischen Parameter an, da eine starke Membranfluiditätsänderung von Plasmamembranen aus Hefezellen, die bei 10°C oder in Gegenwart von Paraquat aufgezogen wurden, erreicht werden konnte. Parallel dazu müßten mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie direkte Fluiditätsmessungen an der Plasmamembran angestellt werden. Sie sollten mit den Messungen aus der Kalorimetrie und den enzymatischen Meßergebnissen Aufschluß darüber geben, welcher Art die Protein-Lipid-Interaktionen beim Purintransportsystem sind. Auch stehen Untersuchungen aus, ob dieses System durch Phospholipide überhaupt beeinflusbar ist. Denn bisher ist noch nicht über eine Phospholipid-Abhängigkeit des Purintransportsystems berichtet worden. Daß die Membranfluidität die kinetischen Parameter von Transportsystemen beeinflusst, zeigte schon Chapman 1976 (13) auf. Die Vorstellungen über Beziehungen der Membranbestandteile zueinander sind noch lange nicht ausdiskutiert (15). Auf alle Fälle sind die Protein-Lipid-Wechselbeziehungen nicht einfach nur auf den Fettsäure-Sättigungsgrad zu reduzieren, sondern die anderen Membranbestandteile wie Phospholipid-Kopfgruppen (87), Sterole (19) und deren prozentuale Verteilung (30) spielen ebenso eine große Rolle. Aus diesen Gründen können aber auch künstliche Lipidmembranen

nur begrenzt zur Erforschung benutzt werden, da teilweise recht große Unterschiede zu Biomembranen bestehen (8, 19, 65, 70, 75). So z.B. erbringen neuere Ergebnisse mit Hilfe von NMR, ESR und Fluoreszenzdepolarisation, daß die verwendeten physikalischen Methoden nur im Vergleich miteinander und parallel an beiden Membrantypen durchgeführt schlüssige Bilder der Wechselwirkungen der Membranbestandteile untereinander liefern (42). Beim Einsatz einzelner Methoden kann ein widersprüchliches Bild entstehen, das den Betrachter irreführt.

Bei diesen Untersuchungen sollte darauf geachtet werden, daß mehrere Untersuchungsmethoden angewendet werden, damit nach Möglichkeit alle Membranbestandteile erfaßt werden. Außerdem sollte bei den kinetischen Analysen nicht nur ein Parameter variiert und untersucht werden. In diesem Sinne will die vorliegende Arbeit nicht den Anspruch erheben, eine völlige Klärung der Frage von Wechselwirkungen zwischen Membranzusammensetzung und Funktionen der Membran herbeizuführen, vielmehr sollen Problematiken aufgezeigt und Denkanstöße gegeben werden für zukünftige Arbeiten auf diesem extrem komplexen Gebiet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ahlers, J., Ahr, E., Seyfahrt, A. 1978, Mol. & Cell. Biochem. 22, 39-49
- 2 Ahlers, J., Rade, S., Stadtländer, K. 1980, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 361, 1261-1262
- 3 Ahlers, J., Peter, H.W. 1982, "Enzymkinetik", G.Fischer Verlag, Stuttgart
- 4 Ahlers, J. 1981, B.B.A. 649, 550-556
- 5 Amatruda, J.M., Finch, E.D. 1979, J.Biol.Chem 254, 2619-2625
- 6 Andreassen, A.A., Stier, T.J.B. 1953, J.Cell. Comp. Physiol. 41, 23-36
- 7 Andreassen, A.A., Stier, T.J.B. 1954, J.Cell. Comp. Physiol. 43, 271-281
- 8 Astin, A.M., Haslam, J.M. 1977, Biochem.J. 166, 287-298
- 9 Autor, A.P. 1982, Biochem.Soc.Transact. 10, 75-76
- 10 Bigalke, Th. 1980, Diplomarbeit, FU Berlin
- 11 Brasitus, T.A., Schachter, D. 1980, B.B.A. 630, 152 - 156
- 12 Breitenreuter, G. 1982, Diplomarbeit, FU Berlin
- 13 Chapman, D. 1976, in "Mammalian cell membranes", G.A.Jamieson & D.M.Robinson, eds., Vol. I, p.97, Butterworth, Boston
- 14 Chapman, D., Gomez-Fernández, J.C., Goñi, F.M. 1979, FEBS Letters 98, 211-223
- 15 Chapman, D., Gomez-Fernández, J.C., Goñi, F.M. 1982, TIBS 7, 67-70
- 16 Culbertson, M.R., Henry, S.A. 1975, Genetics 80, 23-40
- 17 Cullis, P.R., McLaughlin, A.C. 1977, TIBS 2, 196-199
- 18 Van Deenen, L.L.M. 1981, FEBS Letters 123, 3-15
- 19 Demel, R.A., de Kruyff, B. 1976, B.B.A. 457, 109-132
- 20 Diamond, R.J., Rose, A.H. 1970, J.Bacteriol. 102, 311-319
- 21 Dodge, A.D. 1982, Biochem.Soc.Transact. 10, 73-75

- 22 Fährnrich, M. 1981, Diplomarbeit, FU Berlin
- 23 Fährnrich, M., Ahlers, J. 1981, Eur.J.Biochem. 121, 113-118
- 24 Farias, R.N., Bloj, B., Morero, R.D., Siñeriz, F., Trucco, R.E. 1975, B.B.A. 415, 231-251
- 35 Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. 1957, J.Biol.Chem. 226, 497-509
- 26 Forêt, M., Schmidt, R., Reichert, U. 1978, Eur.J. Biochem. 82, 33-43
- 27 Fridovich, J., Hassan, H.M. 1979, TIBS 4, 113-115
- 28 Friedman, K., 1977, J.Membr.Biol. 32, 33-47
- 29 Friedman, K., Glick, D. 1980, J.Membr.Biol. 54, 183-190
- 30 Gomez-Fernández, J.C., Goñi, F.M., Bach, D., Restall, C., Chapman, D. 1979 FEBS Letters 98, 224-228
- 31 Haslam, J.M., Astin, A.M., Nichols, W.W. 1977, Biochem.J. 166, 559-563
- 32 Hassan, H.M., Fridovich, J. 1978, J.Biol.Chem. 253, 8143-8148
- 33 Hayashi, M., Muramatsu, T., Hara, J. 1972, B.B.A. 255, 98-106
- 34 Heremans, K., Wuytack, F. 1980, FEBS Letters 117, 161-163
- 35 Heyneman, R.A., Bernard, D.M., Vercauteren, R.E. 1972, J.Chromat. 68, 285-288
- 36 Hossack, J.A., Sharpe, V.J., Rose, A.H. 1977, J.Bacteriol. 129, 1144-1147
- 37 Hossack, J.A., Rose, A.H. 1976, J.Bacteriol. 127, 67-75
- 38 Hunter, K., Rose, A.H. 1972, B.B.A. 260, 639-653
- 39 Kimmelberg, H.K., Papadhopoulos, D. 1974, J.Biol.Chem. 249, 1071-1080
- 40 Kinoshita, K., Kawato, S., Ikegami, A., Yoshida, S., Oori, Y. 1981, B.B.A. 647, 7-17
- 41 Klausner, R.D., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L., Karnovsky, M.J. 1980, J.Biol.Chem. 255, 1286-1295
- 42 Kleinfeld, A.M., Dragsten, P., Klausner, R.D., Pjura, W.J., Matayoshi, E.D. 1981, B.B.A. 649, 471-480
- 43 de Kruyff, B., van Dijk, P.W.M., Goldbach, R.W., Demel, R.A., van Deenen, L.L.M. 1973, B.B.A. 330, 269-282

- 44 Londesborough, J. 1980, Eur.J.Biochem. 105, 211-215
- 45 Longley, R.P., Rose, A.H., Knights, B.A. 1968, Biochem.J. 108, 401-412
- 46 Madden, T.D., Quinn, P.J. 1979, FEBS Letters 107, 110-112
- 47 Merkel, G.J., Perry, J.J. 1980, B.B.A. 619, 68-75
- 48 Metzler, D.E. 1977, "Biochemistry", Academic Press, New York
- 49 Nes, W.R., Sekula, B.C., Nes, W.D., Adler, J.H. 1978, J.Biol.Chem. 253, 6218-6225
- 50 Nurminen, T. 1976, Dissertation, Helsinki University of Technology, Helsinki
- 51 Okuyama, H., Yamada, K., Kameyama, Y., Ikezawa, H., Akamatsu, Y., Nojima, S. 1977, Biochemistry 16, 2668-2673
- 52 Okuyama, H., Saito, M., Joshi, V.C., Gunsberg, S., Wakil, S.J. 1979, J. Biol.Chem. 254, 12281-12284
- 53 Paton, J.C., Mc Murchie, E.J., May, B.K., Elliott, W.H. 1978, J.Bacteriol. 135, 754-759
- 54 Peter, H.W., Wolf, H.U. 1973, J.Chromatography 82, 15-30
- 55 Porter, K.R., Tucker, J.B. 1981, Scient.Amer. 244, 40-51
- 56 Pryor, W.A. 1973, Fed.Proc. 32, 1862-1869
- 57 Rade, S. 1980, Diplomarbeit, FU Berlin
- 58 Reichert, U. Winter, M. 1974, B.B.A. 356, 108-116
- 59 Reichert, U., Forêt, M. 1977, FEBS Letters 83, 325-328
- 60 Rose, A.H., Harrison, J.S. 1971, "The Yeasts", Academic Press, London
- 61 Rottenberg, H. 1978, FEBS Letters 94, 295-297
- 62 Sandermann, H.Jr. 1978, B.B.A. 515, 209-237
- 63 Schaffner, W., Weissman, C. 1973, Anal.Biochem. 56, 502-514
- 64 Sekiya, T., Kitajima, Y., Nozawa, Y. 1979, B.B.A. 550, 269-278
- 65 Shinitzky, M., Henkart, P. 1979, Int.Rev.Cytol. 60, 121-147
- 66 Silvius, J.R., Read, B.D., Mc Elhaney, R.N. 1978, Science 199, 902-904

- 67 Siminovitch,D.J., Rance,M. Jeffrey,K.R.1980,
FEBS Letters 112, 79-82
- 68 Sinensky, M. 1974, Proc.Nat.Acad.Sci.71, 522-525
- 69 Singer, S.J., Nicolson,G. 1972, Science 175,
720-731
- 70 Singer, S.J.1981, Biochem.Soc.Transact.9, 203-206
- 71 Sokoloff,L., Rothblut,G.,Vogel,S.I.1961,
Textbook of quantitative inorganic analysis,
p. 810, 3rd.ed., J.Wiley & sons, New York
- 72 Stadtlander,K. 1976, Diplomarbeit, FU Berlin
- 73 Stadtlander,K., Reichert,U., Forêt,M. 1979,
Abstracts FEBS Special Meeting on Enzymes,
Dubrovnik
- 74 Stadtlander,K., Ahlers, J. 1982, Abstracts,
FEBS Special Meeting on Cell Function and
Differentiation, Athen
- 75 van der Steen,A.T.M., de Jong,W.A.C., de
Kruyff,B., van Deenen, L.L.M. 1981,
B.B.A. 647, 63-72
- 76 van der Thillart,G., de Bruin,G. 1981,
B.B.A. 640, 439-447
- 77 Thompson, E.D., Parks, L.W. 1974, J.Bacteriol.
120, 779-784
- 78 Uehara,K., Akutsu,H., Kyogohu,Y., Akamatsu,Y.
1977, B.B.A. 466, 393-401
- 79 Verkley, A.J., Vervegaert, P.H.J., van Deenen,
L.L.M., Elbers, P.F. 1972, B.B.A. 288, 326-332
- 80 Watanabe,T., Fukushima,H., Nozawa,Y. 1980,
B.B.A. 620, 133-141
- 81 Watson, K., Houghton, R.L., Bertoli,E.,
Griffiths, D.E. 1975 Biochem. J. 146, 409-416
- 82 Weinmann, H.J. 1979, Dissertation, FU Berlin
- 83 Wilson,K., McLeod,B.J., Cooper,R. 1977,
Ant.v. Leeuwenhoek 43, 233-251
- 84 Winter,M. 1972, Dissertation, FU Berlin
- 85 Wodtke, E. 1976, J.Comp.Physiol. 110, 145-157
- 86 Wodtke,E. 1978, B.B.A. 529, 280-291
- 87 Woytczak,L.,Natecz,M.J.1979, Eur.J.Biochem.94,
99-107
- 88 Yamauchi,T.,Ohki,K.,Maruyama,H.,Nozawa,Y.1981,
B.B.A. 649, 385-392

7. ANHANG

7.1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung der beiden Assistenzprofessoren Dr. J. Ahlers und Dr. U. Reichert 1977 begonnen und nach dem durch Arbeitsplatzwechsel bedingten Weggang von Dr. U. Reichert 1979 in enger Zusammenarbeit mit Dr. J. Ahlers fort- und zu Ende geführt. Das Thema verdanke ich beiden Betreuern, ihnen gilt auch mein Dank für ihre ständige Hilfsbereitschaft, insbesondere Herrn Ahlers für die stets entgegengebrachte Bereitschaft zur Diskussion. Des weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Biomembranen bedanken, ohne deren gute Arbeitsatmosphäre vieles nicht hätte durchgeführt werden können; ebenso beim gesamten Institut, dessen fröhlich-freundliche Atmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit viel beitrug.

7.2. Lebenslauf

Am 27.10.1950 wurde ich als dritter Sohn des selbstständigen Kaufmanns Heinz Stadtlander und seiner Ehefrau Christel, geb. Salzmann, in Madrid / Spanien geboren. Im Oktober 1955 wurde ich an der Deutschen Schule in Madrid eingeschult, an der ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte. Zum Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich mich an der Justus Liebig Universität in Gießen, wechselte aber bereits zum Sommersemester 1970 an die Philipps-Universität in Marburg über, um Biologie zu studieren. Im April 1973 wechselte ich an die Freie Universität in Berlin über, an der ich im April 1976 das Biologie-Studium mit dem Diplom abschloß. Diese Arbeit wurde 1977 in der Arbeitsgruppe "Biomembranen" der F.U. begonnen. In der Zeit von Oktober 1977 bis Juli 1979 habe ich ein Darlehen nach dem Graduiertenförderungsgesetz erhalten. Von Juli 1979 bis November 1980 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter (BAT IIa/2) für die Forschung in der Arbeitsgruppe von Prof. K. Graszynski am Institut für Tierphysiologie und Angewandte Zoologie der F.U. eingestellt, bis September 1981 arbeitslos und seit Oktober 1981 als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe "Biomembranen" von Priv. Doz. Dr. J. Ahlers tätig.

